



(51) 国際特許分類6 C07K 14/52, 1/113, C07H 15/04, A61K 38/20, 38/21, 38/27, 38/45	A1	(11) 国際公開番号 WO98/13381 (43) 国際公開日 1998年4月2日 (02.04.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03435 (22) 国際出願日 1997年9月26日 (26.09.97) (30) 優先権データ 特願平8/273922 1996年9月26日 (26.09.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)(JP/JP) 〒104 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 高原義之(TAKAHARA, Yoshiyuki)(JP/JP) 佐藤晴哉(SATO, Haruya)(JP/JP) 林 永子(HAYASHI, Eiko)(JP/JP) 谷田貝正宣(YATAGAI, Masanobu)(JP/JP) 鈴木 学(SUZUKI, Manabu)(JP/JP) 田畑智之(TABATA, Tomoyuki)(JP/JP) 江島智子(EJIMA, Chieko)(JP/JP) 〒210 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒110 東京都台東区台東一丁目30番9号 第2ツチャビル9階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CN, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: MODIFIED PHYSIOLOGICALLY ACTIVE PROTEINS AND MEDICINAL COMPOSITIONS CONTAINING THE SAME (54) 発明の名称 修飾生理活性蛋白質及びそれを含有する医薬組成物 (57) Abstract Modified physiologically active protein which can be produced by reacting a physiologically active protein having a molecular weight falling within the range of from 1×10^3 to 2×10^5 and carrying at least one Gln residue serving as the substitute of transglutaminase with a branched ligand consisting of an amino acid derivative having a lower binding affinity to the asialoglycoprotein receptor located on hepatic parenchymal cells than that to asialoorsomucoid and carrying an amino group and a galactose (Gal) or N-acetylgalactosamine (GalNAc) group serving as the substrate of transglutaminase in the presence of a transglutaminase originating in a microorganism to thereby form an amide bond between the γ -carboxamide group of the glutamate residue in the physiologically active protein and the terminal amino group in the branched ligand; and a process for producing the same.		

(57) 要約

本発明は、分子量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ の範囲であって、少なくとも1個のトランスグルタミナーゼの基質となるGln残基を有する生理活性蛋白質と、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオロソムコイドに比べ低く、かつ、トランスグルタミナーゼの基質となるアミノ基及びガラクトース(Gal)基又はN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)基を有するアミノ酸誘導体からなる分岐鎖リガンドとを、微生物由来のトランスグルタミナーゼの存在下に反応せしめて、前記生理活性蛋白質中のグルタミン残基のγ-カルボキシアミド基と前記分岐鎖リガンド中の末端アミノ基との間にアミド結合を形成させることにより製造し得る生理活性蛋白質の修飾体、それを含有してなる医薬組成物、及び、それらの製造方法に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を特定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴス	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CN	中国	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
EE	エストニア	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
		LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		

明 細 書

修飾生理活性蛋白質及びそれを含有する医薬組成物

技術分野

本発明は、トランスグルタミナーゼの基質となるGln残基を有する生理活性蛋白質と、分枝型Galまたは分枝型GalNAcを有するアミノ酸誘導体の分岐鎖リガンドとを、トランスグルタミナーゼの存在下に反応せしめて、前記生理活性蛋白質中のグルタミン残基のγ-カルボキシアミド基と前記分岐鎖リガンド中の末端一級アミノ基との間にアミド結合を形成させることからなる、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオロソムコイドに比べ低い肝臓集積性を有する蛋白質の修飾体、その製造方法、及び、当該蛋白質を含有してなる医薬組成物に関する。

本発明の蛋白質の修飾体は、その元となる生理活性蛋白質が有する生理活性を保持しているので、医薬などの有効成分として有用である。

背景技術

近年、バイオテクノロジーの発展に伴い、種々の生理活性蛋白質が大量生産可能となり、新しい医薬品の候補物質として期待を集めている。しかし、これらを実用化するためには解決すべき問題が多数あり、中でもその体内動態の厳密な制御は治療効果増強と副作用軽減を達成するための重要な課題と考えられている。例えば遺伝子組換え型ヒトインターロイキン-2 (rhIL-2) の抗腫瘍効果に関しては数多くの研究がなされ、マウスの肉腫 (Sarcoma)、乳癌 (mammary tumor) 等で効果が、臨床的には黒色腫 (melanoma)、血管内皮腫 (hemangioendothelioma) 等で抗腫瘍効果が認められているが、消化器固形癌に対しては、動物実験においても臨床的にもrhIL-2単独では期待されたほどの効果が得られていない。さらにrhIL-2は静脈内投与後の血中半減期が短いため、その抗腫瘍効果を発揮するには高投与量を必要とする。ところがrhIL-2を大量に投与するとキャピラリーリー

ク シンドローム (capillary leak syndrome) と呼ばれる深刻な副作用を起こし、肺や肝臓での浮腫などの影響を与える。rhIL-2 の治療効果を上げるためにはその体内動態制御が必要となる。このような問題を解決するために、最近 rhIL-2 封入リボソーム、あるいはガラクトース含有リボソームの IL-2 製剤を用い肝類洞細胞周囲に rhIL-2 を集積させ、肝類洞リンパ球等の活性増強による転移性及び原発性肝臓に対する免疫療法の研究がなされている (Jpn. J. Cancer Chemother, (1994), 21(13), 2105-2107)。

一方、哺乳類の肝細胞には、ガラクトース (Gal と略す) あるいは N-アセチルガラクトサミン (GalNAc と略す) を分枝型糖鎖末端にもつ糖蛋白質に対する特異的な膜結合性レセプターであるアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGR と略す) が存在することが知られている (Ashwell, G., et al., Annu. Rev. Biochem, 1982, 51, 531-554)。該レセプターによる糖蛋白質の取り込み機構は、結合親和性が高くかつ強力なものである。これらの性質、さらに ASGR が肝実質細胞に特異的に存在することから、該レセプターは医薬品や遺伝子 DNA を代謝的に重要な本細胞へ特異的に送達させるためのターゲッティングシステムとして注目されている (Wu, G. Y., et al., J. Biol. Chem., (1987), 262, 4429-4432)。

該レセプターによる糖認識機構に関する単離した分枝型オリゴ糖鎖や合成 Gal 誘導体での構造-活性相関研究の結果、結合親和性の強さは Gal 残基間の距離と分枝パターンにより、テトラアンテナ型 > トリアンテナ型 > > バイアンテナ型 > > モノアンテナ型 Gal の順であることが明かとなっている (Lee, Y. C., et al., J. Biol. Chem., (1983), 258, 199-202; Kawaguchi, K., et al., Arch. Biochem. Biophys., (1980), 205, 388-395; Connolly D. T., et al., J. Biol. Chem., (1982), 257, 939-945; Lee, R. T., et al., Biochemistry, (1984),

23, 4255-4259)。

これらの知見からGalあるいはGalNAcを分枝させた合成リガンドを用いDNAやリボソームを肝臓へ集積させ、細胞内へ取り込ませる試みが行われた(特開平5-202085号; Haensler J., et al., Bioconjugate Chem., (1993), 4, 85-93; Merwin, J. R., Bioconjugate Chem., (1994), 5, 612-620)。

しかし、このようなレセプターを介したエンドサイトーシス機構を利用したドラッグデリバリーシステム(DDSと略す)においては、合成した人工リガンドによる細胞内への取り込み効率の低さが課題となっている。この原因はこれらの合成リガンドのASGRに対する結合親和性が、天然のリガンドであるアシアロオロソムコイド(ASOR)やアシアロフェツイン等の糖蛋白質糖鎖に比べ低いためであることがわかってきた(Lee, R. T., et al., Glycoconjugate J., (1987) 4, 317-328; Biesse n, E. A. L., et al., J. Med. Chem., 1995, 38, 1538-1546)。結合親和性が弱いために、これらのGal又はGalNAcを有する合成したリガンドは、ASGRと十分に結合することができず、肝実質細胞へ取り込まれにくく、薬効の発現が十分ではなかった。

一方、我々は動物由来のトランスグルタミナーゼを利用して蛋白質を種々の化合物のアルキルアミン誘導体により位置選択的に修飾するための方法を開発してきた。しかし、この方法では、生理活性蛋白質、例えばrhIL-2等のアミノ酸配列の中のグルタミン残基に直接アルキルアミン誘導体を結合させることは困難であり、当該生理活性蛋白質に動物由来のトランスグルタミナーゼにより結合可能なグルタミン残基を有するペプチドを導入することにより、当該生理活性蛋白質誘導体とアルキルアミン誘導体とが結合した修飾体を得ていた(PCT/J P95/00298(WO96/06181))。

さらに我々は、トランスグルタミナーゼのうち特に蛋白質中のGln残基に対する基質特異性が広い微生物由来トランスグルタミナーゼ(B-TG)を利用することにより、生理活性蛋白質、例えばrhIL-2等のアミノ酸配列に新たな

ペプチド分子を導入することなしに、当該生理活性蛋白質のアミノ酸配列中のグルタミン残基を位置選択的に、ポリリジンやポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコールのアルキルアミン誘導体を用いて修飾を行い得ることを開発してきた（特願平6-270102号（特開平8-89278号）；PCT/JP95/01994（WO96/10089））。

本発明者らは、このような合成リガンドで修飾した修飾体のASGRに対する結合親和性が弱く、当該修飾体が肝実質細胞に取り込まれにくいという問題点や、このような合成リガンドで修飾した修飾体を製造するためには生理活性蛋白質にGln残基を有するペプチドを結合させなければならないという問題点を解決するために、種々検討してきた。

本発明者らは、このような合成リガンドで修飾した生理活性蛋白質の修飾体が、肝臓において肝実質細胞以外の細胞、例えば肝類洞リンパ球等に直接作用して当該生理活性蛋白質の薬理効果を発現することができれば、このような合成リガンドで修飾した修飾体の持っている肝実質細胞に対する結合親和性の低さを逆に利用することにより、サイトカイン等の生理活性蛋白質を肝臓へ集積させ、さらに肝実質細胞へは取り込まれにくいので肝臓中での生理活性蛋白質の保持が可能であることから、肝臓中における他の標的細胞の細胞膜上に存在する特異的レセプターに結合することにより、サイトカインの作用の発現が期待できることに着目した。

また、肝臓へのターゲッティングにより、肺などへの移行量を減少させることになるので、rhIL-2の標的臓器以外における副作用を減少させることも可能となる。

そして、このような肝臓集積性を有し、肝実質細胞に取り込まれることなく肝類洞リンパ球等の活性増強により生理活性蛋白質の薬理効果を有効に発現させるためには、当該生理活性蛋白質をリボソームなどで製剤化するのではなく、直接かつ可能な限り生理活性蛋白質の活性を保持したまま修飾する必要があると考えられた。

例えば、rhIL-2の活性を保持したまま位置選択的に分枝型のGal又はGalNAcなどの合成リガンドで修飾し、rhIL-2を肝実質細胞に取り込

まれることなく、肝実質細胞周辺に集積させることができれば、標的細胞である肝類洞リンパ球上のIL-2レセプター（IL-2R）に結合することにより、それらの活性を増強させ、転移性及び原発性肝癌に対する抗腫瘍効果が期待されることに着目した。

しかし、このような分岐型リガンドで修飾した蛋白質の肝臓集積及び肝臓における活性発現についての知見はまだ得られておらず、ましてや標的臓器以外の副作用の低下についての知見はこれまで全く得られていなかった。

発明の開示

本発明者らは、微生物由来のトランスグルタミナーゼ（B-TG）を用いて、酸性又は塩基性アミノ酸骨格を持つ分岐型Galリガンドで位置選択的に修飾した遺伝子組換えヒトインターロイキン-2（rhIL-2）などの生理活性物質が、未修飾体に対し生物活性を保持し、肝臓集積性を示し、且つ肝実質細胞へ取り込まれにくく、さらにはマウス肝癌モデルにおいて未修飾rhIL-2に対し強く腫瘍縮小させるとの知見を得た。同様に分岐型Galリガンドで修飾したヒトインターフェロン- α が未修飾体に対し生物活性を保持し、肝臓集積性を示すとの知見を得た。

さらに2種のトランスグルタミナーゼを用い該Galリガンドとポリエチレングルコール誘導体とをそれぞれ位置選択的に1分子ずつ導入したIL-2由来融合蛋白質は、より高い肝臓集積性を示すという知見を得た。

本発明はかかる知見に基づき完成された。

即ち、本発明の目的は、合成リガンドのASGRに対する結合親和性が天然型糖鎖に比べ弱いことを利用し、肝臓において生理活性の発現が期待される蛋白質をリガンド修飾し、該生理活性蛋白質を選択的に肝臓へ集積させ、肝臓中に存在する該生理活性蛋白質に対する標的細胞を活性化したり、発生する活性酸素を除去することにより、抗腫瘍効果、抗ウイルス効果、抗炎症効果等の増強を計るとともに、血中及び他の臓器への移行量を減少させることにより副作用を軽減させた生理活性蛋白質の修飾体、及び、それを含有してなる肝臓集積性に優れた医薬組成物を提供することである。

また、本発明の目的は、前記の生理活性蛋白質の修飾体及び製薬上許容される担体とを含有してなる肝臓集積性を有し副作用を軽減させた医薬組成物を提供することにある。

さらに、本発明の目的は、微生物由来のトランスグルタミナーゼを用いて生理活性蛋白質を位置選択的に修飾することにより、生理活性蛋白質の修飾体の製造方法を提供することにある。

本発明は、分子量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ の範囲であって、少なくとも1個のトランスグルタミナーゼの基質となるGln残基を有する生理活性蛋白質と、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオロソムコイドに比べ低く、かつ、トランスグルタミナーゼの基質となるアミノ基及びガラクトース（Gal）基又はN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）基を有するアミノ酸誘導体からなる分岐鎖リガンドとを、微生物由来のトランスグルタミナーゼの存在下に反応せしめて、前記生理活性蛋白質中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と前記分岐鎖リガンド中の末端アミノ基との間にアミド結合を形成させることにより製造し得る生理活性蛋白質の修飾体、及び、製薬上許容される担体とを含有してなる肝臓集積性を有する医薬組成物に関する。

また、本発明は、分子量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ の範囲であって、少なくとも1個のトランスグルタミナーゼの基質となるGln残基を有する生理活性蛋白質と、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオロソムコイドに比べ低く、かつ、トランスグルタミナーゼの基質となるアミノ基及びガラクトース（Gal）基又はN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）基を有するアミノ酸誘導体からなる分岐鎖リガンドとを、微生物由来のトランスグルタミナーゼの存在下に反応せしめて、前記生理活性蛋白質中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と前記分岐鎖リガンド中の末端アミノ基との間にアミド結合を形成させることにより製造し得る、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオロソムコイドに比べ低い肝臓集積性を有する生理活性蛋白質の修飾体に関する。

さらに、本発明は、分子量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ の範囲であって、少なくと

も1個のトランスグルタミナーゼの基質となるGln残基を有する生理活性蛋白質と、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオロソムコイドに比べ低く、かつ、トランスグルタミナーゼの基質となるアミノ基及びガラクトース(Gal)基又はN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)基を有するアミノ酸誘導体からなる分岐鎖リガンドとを、微生物由来のトランスグルタミナーゼの存在下に反応せしめて、前記生理活性蛋白質中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と前記分岐鎖リガンド中の末端アミノ基との間にアミド結合を形成させてなる、前記生理活性蛋白質の修飾体の製造方法に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、(Gal)₃の合成方法を示す。

第2図は、PEG12の合成方法を示す。

第3図は、(GalNAc)₃の合成方法を示す。

第4図は、(Gal)₃-Tyr-Boc及び(GalNAc)₃-Tyr-Bocの合成方法を示す。

第5図は、(Gal)₃-rhIL-2、(GalNAc)₃-rhIL-2、及び、ASORの血漿及び肝臓中の濃度推移を示す。

第6図は、(Gal)₃-rhIL-2のASOR同時投与における臓器分布を示す。

第7図は、(Gal)₃-INF- α のASOR同時投与における臓器分布を示す。

第8図は、PEG12、(Gal)₃-rX2-IL-2の血漿及び肝臓中の濃度推移を示す。

第9図は、(Gal)₃-rhIL-2及び(GalNAc)₃-rhIL-2のマウス分離肝細胞への取り込み及び分解量の推移を示す。

第10図は、(Gal)₃-rhIL-2のS908.D2.vp2肝移植系マウスにおける効果を示す。

第11図は、(Gal)₃-rhIL-2の副作用の結果(臓器重量測定)を示す。

す。

第12図は、(Gal)₃-rhIL-2の副作用の結果(血液生化学試験)を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の分子量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ の範囲、好ましくは $2 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ 、より好ましくは $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ の範囲であって、少なくとも1個のトランスグルタミナーゼの基質となるGln残基を有する生理活性蛋白質としては、肝臓へ集積させることにより活性の増強や副作用の軽減が得られる蛋白質であり、好ましくは分子中に微生物由来トランスグルタミナーゼの基質となるグルタミン残基を少なくとも1個有するものであれば特に制限はない。本発明の生理活性蛋白質を例示すれば、例えば、肝細胞成長因子(HGF)等の肝細胞増殖調節因子；インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-12(IL-12)、インターフェロン- α 、インターフェロン- β 、腫瘍壊死因子(TNF)等のサイトカイン；スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)等の抗酸化酵素等が挙げられる。特に、インターロイキン-2(IL-2)やインターフェロンなどは肝臓への蓄積が望まれており好ましい例である。

これらの生理活性蛋白質はその由来を問わず、動物由来のものであっても、植物由来であっても、微生物由来であってもよい。また、大腸菌、酵母、チャイニーズハムスターオバリ細胞等にこれらの蛋白質の遺伝子を組み込み発現させて生産された蛋白質であってもよい。また、本発明の生理活性蛋白質は、共存蛋白質による影響を最小限に抑えるため、使用前に可能な限り精製しておくのが望ましい。

本発明の該生理活性蛋白質は、分子中にトランスグルタミナーゼ、より望ましくは微生物由来のトランスグルタミナーゼに対する基質となるGln残基を少なくとも1個有するものが好ましい。生理活性蛋白質の分子中のGln残基が微生物由来のトランスグルタミナーゼに対する基質となりうるかについては、佐藤らの(PCT/JP95/00298)蛍光剤であるMDCの導入を確認する方法

に準じて行うことができる。

生理活性蛋白質の分子中にこのようなGln残基がない場合には、微生物由来のトランスグルタミナーゼに対する基質となるGln残基を少なくとも1個有するペプチドを当該生理活性蛋白質のC末端又はN末端などに結合させて、当該生理活性蛋白質に微生物由来のトランスグルタミナーゼに対する基質となるGln残基を導入することもできる。このためのペプチドとしては、アミノ酸数が3～20個程度のものであり、少なくとも1個のGln残基を有するものである。より具体的には、アミノ酸の一字表記法で、

P-K-P-Q-Q-F-M、

R-P-K-P-Q-Q-F-G-L、

R-P-K-P-Q-Q-F-M、

で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを例示することができる。

生理活性蛋白質に微生物由来のトランスグルタミナーゼに対する基質となるGln残基を有するペプチドを導入する方法は、佐藤らの方法(WO 96/06181)に基づいて行うことができる。

また、生理活性蛋白質の分子中に微生物由来のトランスグルタミナーゼに対する基質となるGln残基を有する場合(IL-2のような場合)であっても、さらに前記のようなペプチドを結合させることができる。このような場合には微生物由来のトランスグルタミナーゼが選択的に分子中のGln残基と反応し、当該ペプチド中のGln残基を基質特異性の異なる微生物由来のトランスグルタミナーゼ以外のトランスグルタミナーゼ、例えば、哺乳類由来のトランスグルタミナーゼと反応させることにより、生理活性蛋白質を異なる2種以上のリガンドで修飾することもできる。

例えば、IL-2で例示すれば、IL-2のN末端にP-K-P-Q-Q-F-Mのようなアミノ酸配列を有するペプチドを結合させて、動物由来のトランスグルタミナーゼを用いて当該ペプチド中のGln残基にポリエチレングリコールアルキルアミンなどのリガンドを導入し、次いで微生物由来のトランスグルタミナーゼを用いて本発明の分岐鎖リガンドを選択的にIL-2のアミノ酸配列中に導入することができる。

微生物由来のトランスグルタミナーゼを用いることにより、分子中の特定の位置のGln残基のみに選択的に目的とするリガンドを導入することができるというところを見出したことも本発明の知見のひとつである。

本発明に用いる分岐鎖リガンドとしては、肝実質細胞表面に存在するASGRに対する結合親和性がASORに比べ低いもの、より望ましくはマウス分離肝細胞を用いた取り込み実験において、そのリガンドによる修飾蛋白質が細胞内に取り込まれないものである。即ち、アシアロフェツインあるいはASOR糖鎖中のガラクトースを末端にもつ分枝型糖鎖構造をもとに合成した2分枝あるいは3分枝型のガラクトースあるいはN-アセチルガラクトサミンを含有するリガンドである。分枝のための骨格構造としてはグルタミン酸、アスパラギン酸、リジン等の酸性アミノ酸又は塩基性アミノ酸からなるアミノ酸、あるいはトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等が挙げられる。さらに、トランスグルタミナーゼの基質となるため、末端にアルキルアミン基を有するものである。

より詳細には、本発明のトランスグルタミナーゼの基質となるアミノ基及びガラクトース（Gal）基又はN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）基を有するアミノ酸誘導体からなる分岐鎖リガンドは、次式一般式（I）



（式中、AAは置換基Z又はWのいずれのほうもN-末端であってもよい1個又は2個の塩基性アミノ酸又は酸性アミノ酸を示し、AAが2個のアミノ酸からなるときはこれらのアミノ酸は α 位又は α 位以外の位置でアミド結合をしていてもよく、

Wは式 $-X^1-(CH_2)_n-NH_2$ （式中、nは1～8の整数であり、 X^1 はWがAAで示されるアミノ酸のアミノ基に結合する場合は $-CO-$ を示し、WがAAで示されるアミノ酸のカルボキシル基に結合する場合は $-NH-$ を示す。）で示されるアルキルアミン誘導体であり、

Zは式 $-X^2-(CH_2CH_2O)_p-R$ 又は式 $-X^2-(CH_2)_q-OR$ （式中、Rはガラクトース（Gal）又はN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）であり、pは1～6の整数であり、qは1～18の整数であり、 X^2 はZがAAで示されるアミノ酸のアミノ基に結合する場合は $-CO-$ を示し、Zが

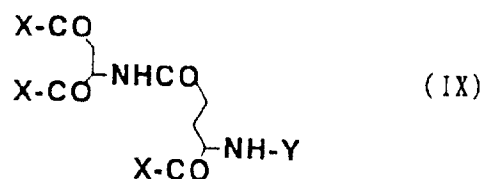
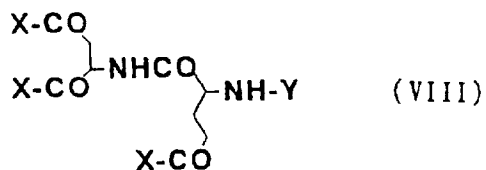
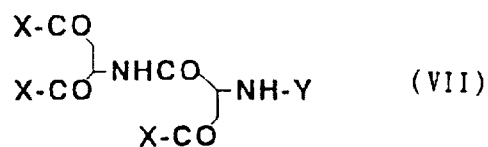
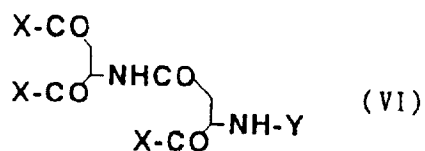
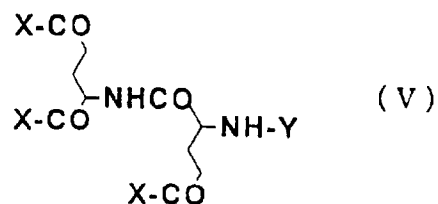
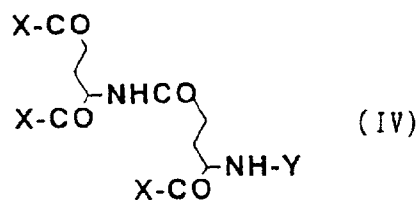
AAで示されるアミノ酸のカルボキシル基に結合する場合は—NH—を示す。)

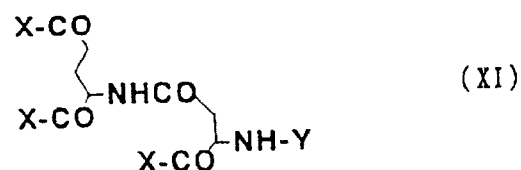
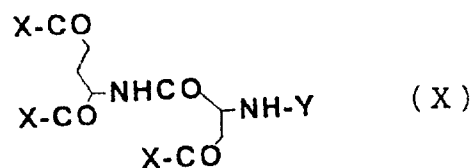
で示されるGalまたはGalNAcを有する基である。)

で示される分枝型Gal又はGalNAcを有するアミノ酸誘導体が好ましい。

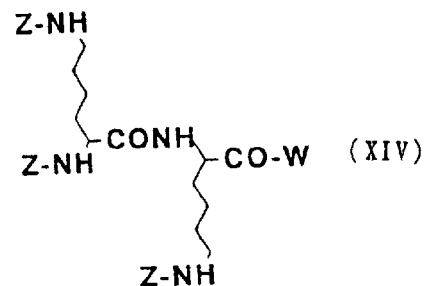
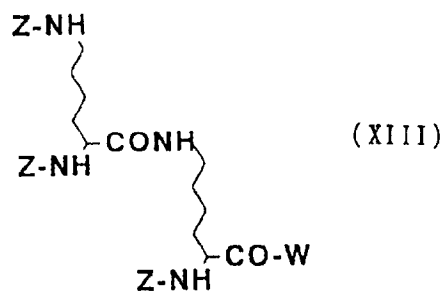
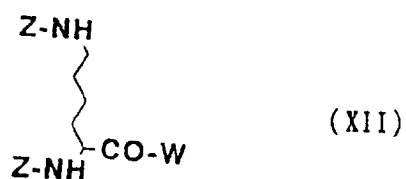
前記一般式(I)で示される分岐鎖リガンドの基AAとしては、1個又は2個の同一又は異なるグルタミン酸又はアスパラギン酸から誘導されるものが好ましい。

さらに詳細には、本発明の分岐鎖リガンドとして次式(II)から(XV)で示される化合物を例示することができる。



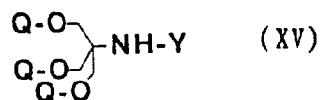


(上記一般式 (I I) ~ (X I) 中、XはR-(OCH₂CH₂)_p-NH-またはR-O(CH₂)_q-NH-(ただし、RはガラクトースまたはN-アセチルガラクトサミン、pは1~6の整数、qは1~18の整数)であり、Yは-CO-(CH₂)_n-NH₂(ただし、nは1~8の整数)である。)



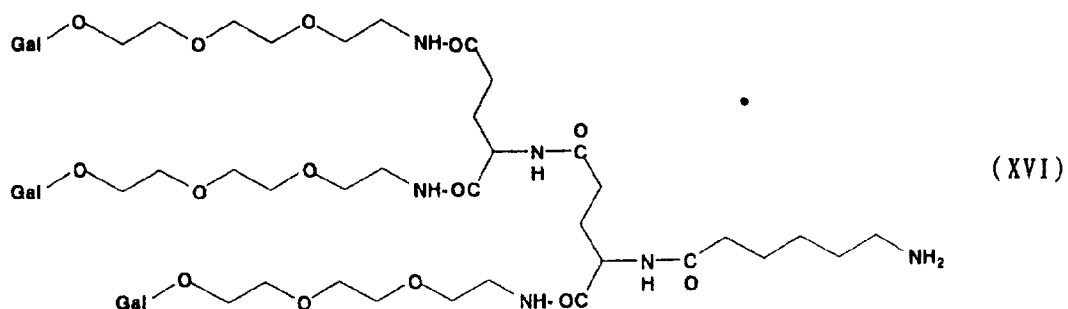
(上記一般式 (X I I) ~ (X I V) 中、ZはR(OCH₂CH₂)_pCO-またはR-O(CH₂)_qCO-(ただし、RはガラクトースまたはN-アセチルガラ

クトサミン、 p は1～6の整数、 q は1～18の整数）であり、 W は $-NH(CH_2)_nNH_2$ （ただし、 n は1～8の整数）である。）



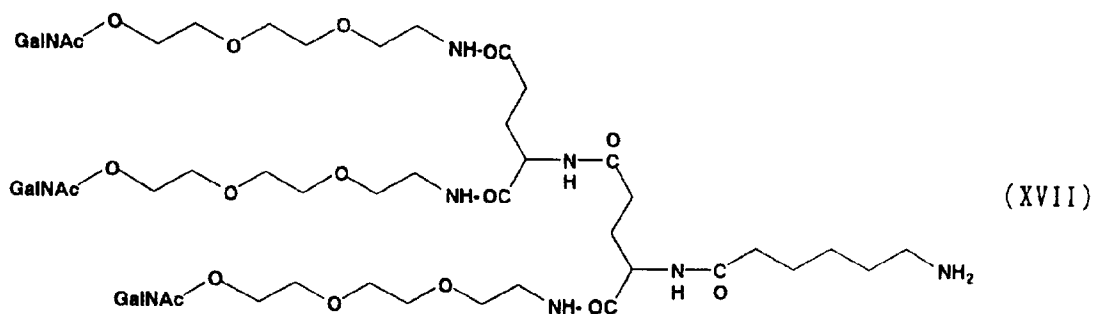
（上記一般式（XV）中、 Q は $R(OCH_2CH_2)_p-$ または $R-O(CH_2)_q-$ （ただし、 R はガラクトースまたは N -アセチルガラクトサミン、 p は1～6の整数、 q は1～18の整数であり、 Y は $-CO(CH_2)_nNH_2$ （ただし、 n は1～8の整数）である。）

本発明の分岐鎖リガンドとしては、その目的に応じて、また、生理活性蛋白質の種類に応じて、前記した種々のものを使用することができる。より具体的には、一般式（IV）で示されるトリアンテナ型のリガンドが好ましく、さらに具体的には次式（XVI）



（式中、Galはガラクトースを示す。）

で示されるリガンド（以下、（Gal）₃ともいう。）や、次式（XVII）



(式中、GalNAcはN-アセチルガラクトサミンを示す。)

で示されるリガンド(以下、(GalNAc)₃ともいう。)が好ましい。なお、前記式(XVI)で示されるリガンド(Gal)₃は、第1図の化合物(3-14)で示されるリガンドであり、前記式(XVII)で示されるリガンド(GalNAc)₃は、第3図において化合物(14)として示されるリガンドである。

本発明の分岐鎖リガンドは、通常の有機化学の合成方法により製造することができる。通常は、モノ又はジアミノ酸にブトキシカルボニル基などのペプチド化学で常用される保護基で保護されたアミノ基を有するアルキル基の誘導体を反応させて、モノ又はジアミノ酸のアミノ基が保護されたアルキルアミン誘導体を形成させ、次いでGal基又はGalNAc基を有する基を導入させた後、保護基を脱離させて目的とするリガンドを合成することができる。また、前記反応において、アルキルアミン基の導入とGal基又はGalNAc基を有する基の導入の順序を逆にすることもできる。

より詳細には、一般式(II)から(XI)で表される分岐鎖リガンドの合成は、例えば次のようにして行うことができる。即ち、特公平5-202085号における方法にしたがってグルタミン酸、アスパラギン酸を利用してN-Boc-アルキルアミンが結合した分枝型骨格構造を構築する。次にそのカルボキシル基と、糖の水酸基をアセチル基で保護したトリエチレングリコールアミン誘導体のアミノ基とを、脱水縮合条件下、具体的には反応に関与しない溶媒(例えば、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、塩化メチレン、塩化エチレン等)中で、適当な触媒(例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド等)の存在下、0℃～室温の反応温度で1～24時間反応させた後、脱保護することにより得ることができる。

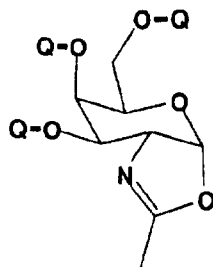
一般式(XII)から(XIV)で表される化合物の合成は、Haeslerらの方法(Bioconjugate Chem., (1993), 4, 85-93)をもとにリジンを利用してアルキルアミン結合分枝型骨格構造を構築することができる。

一般式(XV)で表される化合物の合成は、Biessenらの方法(J. Med. Chem., (1995), 38, 1538-1546)をも

とにトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを利用しアルキルアミン結合分枝型骨格構造を構築することができる。

前記した方法に準じて式（X V I）で示されるリガンドを製造することができる（第 1 図参照）。また、前記式（X V I I）で示される（G a l N A c）もこれらの方法に準じて製造することもできるが、以下に示す方法により効率的に製造することができる（第 3 図参照）。

まず、ガラクトサミン又はその塩をアセチル化して、水酸基が保護基で保護された N-アセチルガラクトサミンを得、次いでこれをトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリルなどの縮合剤の存在下に閉環させて次式（X V I I I）



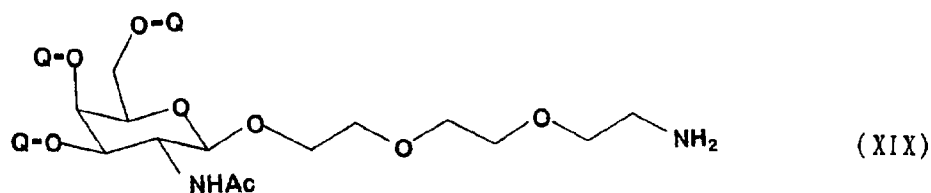
(XVIII)

（式中、Q は、水素原子又は水酸基の保護基を示す。）

で示される化合物とする。この式（X V I I I）で示される化合物の保護基がアセチル基である化合物が、第 3 図中で化合物（8）として記載されている化合物である。

一方、2-〔2-（2-クロロエトキシ）エトキシ〕エタノール（第 3 図中の化合物（1））を、カリウムフタリイミドなどの金属化イミドなどを用いてアミノ化し、生成したアミノ基をベンジルオキシカルボニル基などの保護基で保護した化合物（第 3 図中の化合物（4））を製造する。

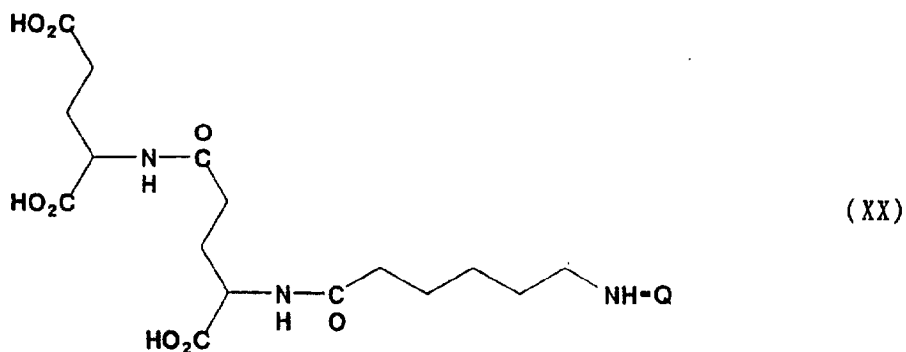
得られたアミノ基が保護された 2-〔2-（2-アミノエトキシ）エトキシ〕エタノールと、前記式（X V I I I）で示される化合物をトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリルなどの縮合剤の存在下に反応させた後、保護基を脱離させると次式（X I X）



(式中、Qは、水素原子又は水酸基の保護基を示す。)

で示される化合物を製造することができる。この式(XIX)で示される化合物のN-アセチルガラクトサミンの水酸基の保護基がアセチル基である化合物が、第3図中で化合物(10)として示されている。

得られた式(XIX)で示される化合物と、N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-グルタミン酸- α -ベンジルエステル及びL-グルタミン酸- α , γ -ジベンジルエステル-p-トルエンスルホン酸塩を出発原料にして合成することができる次式(XX)



(式中、Qは、水素原子又はアミノ基の保護基を示す。)

で示される化合物とを、DCCなどの縮合剤の存在下に縮合させ、必要に応じて保護基を脱離させることにより目的とする式(XVII)で示されるリガンドを製造することができる。

置換基Qで示される水酸基又はアミノ基の保護基としては、通常のペプチド化

学において使用されるものを使用することができるが、アセチル基、*t*-ブトキシカルボニル基 (Boc)、ベンジルオキシカルボニル基 (Cbz) などが好ましい。

したがって、本発明は、前記した方法による式 (XVII) で示されるリガンドの製造方法を提供するものでもある。

また、これらの分岐鎖リガンドと生理活性蛋白質とを微生物由来のトランスグルタミナーゼ (B-TG) の存在下に反応せしめる方法は、高原らの方法 (特開平 8-89278 号) あるいは佐藤らの方法 (WO 96/06181) に準じて、水溶液中、より好ましくは pH 7.5 前後で、室温で 12 時間、生理活性蛋白質、合成リガンド、及びトランスグルタミナーゼ、より好ましくは微生物由来トランスグルタミナーゼを反応させる。生理活性蛋白質と合成リガンドとの濃度比は 1 : 100 ~ 1 : 2000 の範囲がよい。またトランスグルタミナーゼの使用量は蛋白質 1 nmol 当たり 0.01 ~ 1 ユニットである。さらに合成リガンドに加え、ポリエチレングリコールのアルキルアミン誘導体による 2 分子修飾により、蛋白質の血中における滞留性及び安定性を高め、肝臓への集積量を高めることも可能である。即ち、基質特異性の異なる 2 種のトランスグルタミナーゼ、より望ましくは微生物由来トランスグルタミナーゼとモルモット肝由来トランスグルタミナーゼを使い分けることにより、2 つの異なる基質をそれぞれ位置選択的に結合させることができる。

本発明の医薬組成物は、リガンドに結合させる生理活性蛋白質に応じて、悪性腫瘍治療剤、抗ウイルス剤、抗リウマチ剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、循環機能改善剤、内分泌機能改善薬、蛋白質の異常発現あるいは機能異常によって生じる疾患に対する治療薬などとして使用することができる。

本発明の医薬組成物は、例えばその用途に応じて、静注および筋注などの注射剤、直腸投与剤、油脂性坐剤、水溶性坐剤などのいずれかの製剤形態に調製することができる。これらの各種製剤は、通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、潤滑剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、無痛化剤、安定化剤などを必要に応じて用いて常法により製造することができる。使用可能な無毒性の上記添加物としては、例えば乳糖、果糖、

ブドウ糖、でん粉、ゼラチン、炭酸マグネシウム、合成ケイ酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースまたはその塩、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、シロップ、ワセリン、グリセリン、エタノール、プロピレングリコール、クエン酸、塩化ナトリウム、亜硫酸ソーダ、リン酸ナトリウムなどが挙げられる。

本発明の医薬組成物の投与方法は、静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与、経粘膜投与等の非経口投与が好ましく、より望ましくは静脈内投与がよい。また、その投与量としては肝臓への送達効率を最大にするため、肝臓の実質細胞に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターへの飽和結合量より低い量であることが望ましい。従来の修飾されていない生理活性蛋白質の投与量に比べて、本発明の修飾体の投与量はより小量（少なくとも 1 / 4 程度）とすることができる。

その投与量は、使用する生理活性蛋白質によっても異なるのみならず、用法、患者の年齢、性別、症状の程度などを考慮して適宜決定される。本発明の医薬組成物はその肝臓集積性により投与量を未修飾蛋白質の数分の一程度までさげることができる。

また、本発明は、本発明の生理活性蛋白質の修飾体の治療又は予防に有効な量を投与してなる、ヒトを含む動物の疾患、例えば、悪性腫瘍、ウイルス感染、アレルギー性疾患、免疫性疾患、循環器系疾患、および内分泌系疾患などの疾患の治療法又は予防法を提供するものである。

さらに、本発明は、本発明の生理活性蛋白質の修飾体の治療・予防に必要な量を含有してなる治療・予防、例えば、悪性腫瘍治療剤、抗ウイルス剤、抗リウマチ剤、抗アレルギー剤、免疫調節剤、循環機能改善剤および内分泌機能改善剤などの薬剤の製造のための使用を提供するものである。

実施例

以下に本発明を、実施例としてより具体的に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

実施例 1 (Gal)₃-rhIL-2 の調製

0.25 MのNaClを含む50 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した rhIL-2 溶液 (39 mL) を 200 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で予め平衡化した Sephadex G-25 column (Pharmacia 社製) にアプライし、同緩衝液で溶出した。溶出液を 280 nm の吸光度でモニターし蛋白質の溶出画分を得た (48 mL)。この溶出画分の蛋白質濃度を 5 μ M/mL に調製した (330 mL)。

この溶出画分に、第1図に示したように、佐藤らの方法 (PCT/JP/95/00298) にしたがって合成した分枝型 Gal リガンド ((Gal)₃, 472 mg) を添加した。

該反応液に微生物由来トランスグルタミナーゼ 60 U を添加し、室温で一晩インキュベートした。

反応液を「Sep-Pak C8 Cartridge」(Waters 社製) で前処理後、「YMC-Pack C8-AP」カラム (4.6 \times 250 mm、山村化学社製) を用いた逆相 HPLC により数回にわたって精製し、未反応の rhIL-2 画分及び (Gal)₃ を除去した。

精製物の純度を「Phast system」(Pharmacia 社製) を用いた SDS-PAGE (「Homogenous 20」ゲル使用) により分析した結果、(Gal)₃ 修飾体 ((Gal)₃-rhIL-2) は未修飾体に対し (Gal)₃ が 1 分子結合したと予想される約 2 KDa 程度分子量が上昇した位置にのみ蛋白質由来のバンドを確認した。

収量 5.3 mg (収率 21%)。この分取画分の一部をサンプリング後、PBS (-) (pH 7.5) で予め平衡化した Sephadex G-25 column にアプライし、同緩衝液で溶出し蛋白質画分を得た (収量 3.1 mg)。

実施例 2 PEG12, (Gal)₃-rX2-IL-2 の調製

(1) PEG12-rX2-IL-2 の調製

佐藤らの方法 (PCT/JP/95/00298) にしたがって調製した rX2-IL-2 (hIL-2 の N 末端に P-K-P-Q-Q-F-M のアミノ酸配列が付加した融合蛋白質) の 5 mL 溶液を、100 mM トリス-塩酸緩衝液 (1

0 mM CaCl_2 含有、pH 7.5) で予め平衡化した Sephadex G-25 column (Pharmacia 社製) にアプライし、同緩衝液で溶出した。溶出液を 280 nm の吸光度でモニターし蛋白質の溶出画分を得た (6 mL)。この溶出画分の蛋白質濃度を $25 \mu\text{M}/\text{mL}$ に調製した (10 mL)。

この溶出画分に、第2図に示したように、佐藤らの方法 (PCT/JP/95/00298) にしたがって合成したポリエチレングリコールアルキルアミン (第2図の式 (2-3)、PEG 12、平均分子量 12 KDa、750 mg) を添加した。

該反応液にモルモット肝由来トランスグルタミナーゼ (Sigma 社製) 2 U を添加し、室温で一晩インキュベートした。

反応液を「Sep-Pak C8 Cartridge」(Waters 社製) で前処理後、「YMC-Pack C8-AP」カラム (4.6 × 250 mm、山村化学社製) を用いた逆相 HPLC により数回にわたって精製し、未反応の rX2-IL-2 画分及び PEG 12 を除去した。

精製物の純度を「Phast system」(Pharmacia 社製) を用いた SDS-PAGE (「Homogenous 20」ゲル使用) により分析した結果、PEG 12 修飾体 (PEG 12-rX2-IL-2) は未修飾体に対し PEG 12 が 1 分子結合したと予想される約 20 KDa 程度分子量が上昇した位置にのみ蛋白質由来のバンドを確認した。収量 0.484 mg (収率 12%)。

(2) PEG 12, (Gal)₃-rX2-IL-2 の調製

上記 PEG 12-rX2-IL-2 溶液を 200 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で予め平衡化した Sephadex G-25 column (Pharmacia 社製) にアプライし、同緩衝液で溶出した溶出液を 280 nm の吸光度でモニターし蛋白質の溶出画分を得た (3 mL)。この溶出画分の蛋白質濃度を $5 \mu\text{M}/\text{mL}$ に調製し (3 mL)、佐藤らの方法 (PCT/JP/95/00298) にしたがって合成したガラクトースリガンド ((Gal)₃、17 mg) を添加した。該反応液に微生物由来トランスグルタミナーゼ 15 U を添加し、室温で一晩インキュベートした。

反応液を「Sep-Pak C8 Cartridge」(Waters社製)で前処理後、「YMC-Pack C8-AP」カラム(4.6×250mm、山村化学社製)を用いた逆相HPLCにより数回にわたって精製し、未反応のPEG12-rX2-IL-2画分及び(Gal)₃を除去した。

精製物の純度を「Phast system」(Pharmacia社製)を用いたSDS-PAGE(「Homogenous 20」ゲル使用)により分析した結果、PEG12, (Gal)₃修飾体(PEG12, (Gal)₃-rX2-IL-2)はPEG12-rX2-IL-2に対し(Gal)₃が1分子結合したと予想される約2KDa程度分子量が上昇した位置にのみ蛋白質由来のバンドを確認した。収量0.05mg(収率1%)。

実施例3 ((GalNAc)₃の合成(第3図参照))

(1) 化合物(4)の合成

化合物(4)の合成は山田らの方法(特開平5-202085号)を改良して行った。2-[2-(2-クロロエトキシ)エトキシ]エタノール(化合物(1)) 500g(2.96mol)をカリウムフタルイミド596g(3.22mol)のDMF(3.5L)混合液に加え、油浴(100℃)中で加熱しながら17時間攪拌した。反応液を室温まで冷却し、不溶物をろ過後、ろ液を減圧濃縮した。残渣を塩化メチレン(300mL)で抽出し、溶媒を減圧留去することにより黄色油状物(粗製物)として化合物(2) 895.6gを得た。

得られた粗製物をEtOH(14L)に溶解し、80%ヒドラジン1水和物198mL(3.27mol)を加えた後、メカニカルスターラーで攪拌しながら2時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、不溶物をろ過し、減圧濃縮した。残渣に塩化メチレン3Lを加え、室温下30分攪拌後、不溶物をろ過した。ろ液を減圧濃縮することによって、化合物(3)を黄色油状物(粗製物)として484g得た。

上記化合物(3) 483.8gを水5.4Lに溶解し、氷水浴中にて冷却した。攪拌しながらNaHCO₃(273g)と塩化ベンジルオキシカルボニル(33%トルエン溶液、1550mL)を交互に5回ずつ加えた後、室温下で一晩攪

拌した。反応液を分層後、水槽を酢酸エチルで抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧留去して得られた残渣を、酢酸エチルを溶出液とするシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル＝4 K g）で精製することにより、標記化合物（4）を無色油状物として393 g得た。

（2）化合物（9）の合成

ガラクトサミン誘導体である化合物（9）の合成は特開平5-202085号の方法に従って行った。

即ち、ガラクトサミン塩酸塩（化合物（5））150 gをMeOH 2.8 L及びトリエチルアミン 190 mLの混合溶媒に溶解し、室温にて無水酢酸 1.25 Lを滴下した。室温にて一晩攪拌後、溶媒を減圧留去した。ついで、ピリジン 1500 mL及び無水酢酸 500 mLを加え、室温にて一晩攪拌した。再び溶媒を減圧留去後、残渣を酢酸エチル溶液とし、水洗し、さらに濃縮をした。

析出した結晶をろ取し、ろ液を濃縮後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製することにより、 α 、 β -アセテート体（化合物（7）、（6））混合物（2：1）89.4 gを得た（シリカゲル＝4 kg、CHCl₃：MeOH＝10：1）。

さらに母液を濃縮乾固した後、シリカゲルカラムクロマトにて精製し、 α -アセテート体（化合物（7））23.9 gを得た（シリカゲル＝4 kg、AcOEt）。

上記、 α 、 β -アセテート体（化合物（7）、（6））混合物（2：1）81.4 gを1, 2-ジクロロエタン（EDC）1 Lに溶解し、室温にてトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル（TMSOTf）39.8 mLを滴下した。40℃にて一晩反応後、Et₃Nを2倍当量加えた後、溶媒を留去した。一方、上記 α -アセテート体（化合物（7））23.9 gを、1, 2-ジクロロエタン（EDC）300 mLに溶解し、室温にてTMSOTf 11.7 mLを滴下した。40℃で3時間反応後、Et₃Nを2倍当量加えた後、溶媒を留去した。残渣を併せてシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、化合物（8） 83.6 gを

得た（シリカゲル＝4 kg、 CHCl_3 ： MeOH ＝20：1）。

上記化合物（8） 83.0 g及び先に合成した化合物（4） 142.8 gを、1,2-ジクロロメタン1 Lに溶解し、MS4A（モレキュラーシーブス4A）存在下、50℃にて TMSOTf 53.2 mLを滴下した。室温にて一晩攪拌して反応させた後、水 1 L中に加え、クロロホルム 2 Lで抽出した。水洗、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトにて2度に渡り精製し、145 gの標記化合物（化合物（9））を得た（シリカゲル＝4 kg、 $\text{AcOEt} \rightarrow \text{CHCl}_3$ ： MeOH ＝20：1～10：1）。

（3） 化合物（14）（ $(\text{GalNAc})_3$ ）の合成

上記化合物（9） 71.1 gを、 EtOH 1.5 Lに溶解し、p-トルエンスルホン酸1水和物 22.8 gを加え、5% Pd/C 22.6 g存在下水素雰囲気下、室温にて一晩攪拌した。反応液をセライトでろ過後、減圧にて濃縮乾固した。残渣をアセトニトリル 500 mLを用いて溶解及び濃縮乾固の操作を4回行なった。残渣をアセトニトリル 200 mLに溶解し、N-メチルモルホリンを 13.3 mL加え、化合物（10）の溶液を調製した。

一方、佐藤らの方法（PCT/JP95/00298（WO 96/06181））に従って、N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-グルタミン酸- α -ベンジルエステル及びL-グルタミン酸- α , γ -ジベンジルエスデル p-トルエンスルホン酸塩を出発原料にして合成した化合物（11） 19.3 gのDMF 100 mL溶液を氷水浴にて冷却し、N-ヒドロキシコハク酸イミド 13.7 g、DCC 4.63 gを加え数分間攪拌した。この反応液に上記化合物（10） 78 gのアセトニトリル溶液 200 mLを滴下し、冷却下（15℃）で一晩攪拌した。不溶物をろ別し、溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより中間体である化合物（12）を無色固体として 16.1 g得た（シリカゲル＝4 kg、 CHCl_3 ： MeOH ＝20：1～10：1）。化合物（12）の構造については FAB-MS (m/z ($M+H$)⁺ 1870.9) により確認した。

調製した化合物(12) 15.3 gの塩化メチレン(65 mL)溶液を氷水浴にて冷却し、トリフルオロ酢酸(TFA) 65 mLを加えた後、室温下で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、残留TFAを除くために、残渣をEtOH 50 mLに溶解し、減圧乾固した。この操作を3回繰り返した後、残渣を塩化メチレン70 mLに溶解し、氷水浴で冷却しながら28% NaOMe/MeOH溶液を加え中和した。溶媒を減圧留去後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製することにより、中間体である化合物(13) 11.2 gを得た(シリカゲル=460 g、CH₂Cl₂:MeOH=10:1~3:1)。化合物(13)の構造については、¹H NMR及び エレクトロスプレーイオン化四重極型マスマススペクトロメトリー(ESI+QIMS)により確認した。

¹H NMR (600 MHz、CDCl₃) : δ

2.01 (s, Ac, 9H)、2.02 (s, Ac, 9H)、

2.05 (s, Ac, 9H)、2.15 (s, Ac, 9H)、

3.05-3.16 (br, -CH₂-NH₂, 2H)

ESI+QIMS : m/z (M+H)⁺ 1770.4

上記化合物(13) 6.64 gをMeOH 184 mLに溶解し、氷水浴で冷却しながら、28% NaOMe/MeOH溶液 0.83 mLを加えた。室温下で5時間攪拌後、反応液を氷水浴で冷却し、MeOHで十分洗浄したDowex 50Wを加え、反応液を中和した。樹脂をろ別後、溶媒を減圧留去し、残渣を50℃で一晩減圧乾燥することにより、(GalNAc)₃(化合物(14))を3.4 g得た。

¹H NMR (600 MHz、D₂O) : δ

1.48-1.55 (m, 2H)、1.70-1.83 (m, 4H)、

2.04-2.12 (m, 2H)、2.17 (s, 9H)、

2.16-2.24 (m, 2H)、2.47 (t, 4H)、

2.55 (t, 2H)、3.14 (t, 2H)、

3.45-3.58 (m, 6H)、3.70-3.95 (m, 41H)、

4.02-4.08 (m, 6H)、4.12-4.18 (br, 2H)、

4.32-4.42 (m, 2H)、4.63 (d, 2H)

^{13}C NMR (150 MHz, D_2O) : δ

23.0、25.4、25.9、27.2、27.6、27.9、
32.2、32.6、35.8、39.7、40.0、49.6、
53.1、54.0、54.2、61.7、68.6、69.5、
69.6、70.2、70.4、71.8、75.9、102.3、
174.3、174.3、175.4、175.6、176.6、
177.5

ESI+QIMS : m/z (M+H) $^+$ 1393.1

実施例4 (GalNAc) $_3$ -IL-2の調製

0.25 MのNaClを含む50 mM酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解した rhIL-2 溶液 (11 mL) を 200 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で予め平衡化した Sephadex G-25 カラム (Pharmacia 社製) にアプライし、同緩衝液で溶出した。溶出液を 280 nm の吸光度でモニターし蛋白質の溶出画分を得た (20 mL、6.5 μM)。この溶出画分の蛋白質濃度を 5 μM に調製した (26 mL)。

この溶出画分のうち 13 mL を、前記実施例 3 に示す方法にしたがって合成した分枝型 N-アセチルガラクトサミンリガンド ((GalNAc) $_3$ 、3.47 mg) を添加した。該反応液に微生物起源トランスグルタミナーゼ約 32.5 U を添加し、室温で一晩インキュベートした。

反応液を「Sep-pak C8 Cartridge」(Waters 社製) で前処理後、「YMC-Pack C8-AP」カラム (4.6 x 250 mm、山村化学社製) を用いた逆相 HPLC により数回にわたって精製し、未反応の IL-2 画分及び (GalNAc) $_3$ を除去した。

精製物の純度を「Phast system」(Pharmacia 社製) を用いた SDS-PAGE (「Homogenous 20」ゲル使用) により分析した結果、(GalNAc) $_3$ 修飾体 ((GalNAc) $_3$ -rhIL-2) は未修飾体に対し (GalNAc) $_3$ が 1 分子結合したと予想される約 2 KDa

程度分子量が上昇した位置にのみ蛋白質由来のバンドを確認した。収量、401 μ g (収率 40%)。

分取画分の一部をPBS (pH 7.4) で平衡化したモルカットL (LGC、ミリポア社製) で濃縮操作を繰り返し行うことにより、バッファー交換を行った。

実施例5 (Gal)₃-INF- α の調製

凍結乾燥されたヒトINF- α (2b) (生化学工業社製) 200 μ gを1465 μ lの200 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解させた後、合成した分枝型ガラクトースリガンド ((Gal)₃、6.5 mg) を添加した。該反応液に微生物起源トランスグルタミナーゼ約0.7 Uを添加し、室温で4時間インキュベートした。

反応液を「YMC-Pack C8-AP」カラム (4.6 x 250 mm、山村化学社製) を用いた逆相HPLCにより数回にわたって精製し、未反応のINF- α (2b) 画分及び(Gal)₃を除去した。分取画分をPBS (pH 7.4) で平衡化したモルカットL (LGC、ミリポア社製) で濃縮操作を繰り返し行うことにより、バッファー交換を行った。

精製物の純度を「Phast system」(Pharmacia社製) を用いたSDS-PAGE (「Homogenous 20」ゲル使用) により分析した結果、(Gal)₃修飾体 ((Gal)₃-INF- α) は未修飾体に対し(Gal)₃が1分子結合したと予想される約2 KDa程度分子量が上昇した位置にのみ蛋白質由来のバンドを確認した。収量150 μ g (収率75%)。

実施例6 (Gal)₃-Tyr-Boc、(GalNAc)₃-Tyr-Bocの調製

ヨードラベル化のためのTyr誘導体の合成は田村らの方法 (T. Tamura et al., Anal. Biochem. 216, 335-344 (1994)) に従って行った (第4図参照)。即ち30 μ molの(Gal)₃あるいは(GalNAc)₃を3.6 mlのジメチルホルムアミド中に溶解させ、1.13 gのBoc-Tyr-NHS (Sigma社製) を添加し、50℃で5時間攪拌した。反応液を冷却後、1 NのNaOHを

加え、遠心分離により沈殿物を除去した。該上澄み液を1% (w) のピリジン及び酢酸で平衡化した Sephadex G-25 カラム (ファルマシア社製、1.6 x 70 cm) に添加し、280 nm でモニターされた Tyr-Boc 誘導体画分を分取した。該分取画分を凍結乾燥後、再度0.1% TFA 溶液に溶解させ、「Inertsil ODS-2」カラム (4.6 x 150 mm、GL Science Inc. 社製) を用いた逆相 HPLC により精製し、ピーク純度90%以上の Tyr-Boc 誘導体14.7 mg ((Gal)₃-Tyr-Boc) 及び28.9 mg ((GalNAc)₃-Tyr-Boc) を得た。なお、生成物の構造は、エレクトロスプレーイオン化マスマススペクトロメトリー (ESI-MS) により確認した。

ESI-MS :

((Gal)₃-Tyr-Boc ; m/z (M+H)⁺ 1532.8、
((GalNAc)₃-Tyr-Boc ; m/z (M+H)⁺ 1655.6

実施例7 修飾位置の確認

上記実施例1の (Gal)₃-rhIL-2 の逆相 HPLC サンプリング画分及び rhIL-2 の凍結乾燥体各100 μg (IL-2 換算) を辻らの方法 (Biochemistry, (1987), 26, 3129-3134) にしたがって還元カルボキシメチル化した。該還元カルボキシメチル化体の凍結乾燥粉末50 μg を炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 7.9) 50 μL に溶かし、「V8 protease」2 μg を加え37℃で22時間消化した後、凍結乾燥した。続いて「TPCK-トリプシン」2 μg を50 mM 炭酸水素アンモニウム緩衝液 (pH 7.9) 50 μL に溶かして加え、37℃で4時間酵素分解した。反応液をそのまま LC/MS により分析することによりペプチドマップを作製し比較した結果、(Gal)₃-rhIL-2 において Gln-74 を含むアミノ酸配列由来のピークの消失が観察された。この結果、本発明の分岐鎖リガンド (Gal)₃ は B-TG により rhIL-2 の Gln-74 に位置選択的に結合していることを確認した。

実施例 8 修飾体の IL-2 活性

ATCCより入手したIL-2依存性マウス細胞「CTLL-2」(ATCC T1B 214)を用い、Gillisらの方法(J. Immunol., 120, 2027 (1978))であるチミジンの取込みを標識にしたT-cell増殖アッセイ法にしたがって(Gal)₃-rhIL-2、(GalNAc)₃-rhIL-2、PEG12、(Gal)₃-rX2-IL-2及びrhIL-2のIL-2生物活性を測定した。

その結果、(Gal)₃-rhIL-2のrhIL-2に対する比活性は102%であり、修飾体はIL-2の生物活性を保持していることが示された。また、(GalNAc)₃-rhIL-2のrhIL-2に対する比活性は110%であり、(GalNAc)₃修飾体はIL-2の生物活性を保持していることが示された。さらに、PEG12、(Gal)₃-rX2-IL-2のrX2-IL-2に対する比活性は126%であり、2分子修飾体はrX2-IL-2の生物活性を保持していることが示された。

実施例 9 修飾体 INF の活性

ヒトIFNバイオアッセイは、FL細胞を用い、ウイルスによる細胞変性効果の阻止に基づく渡部らの方法(Lymphokines and Interferones; A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1987)に従って行った。即ち、100%細胞変性を引き起こす量のウイルスを用いたとき、細胞をあらかじめIFN試料希釈液で処理しておくことによってウイルスによる細胞変性が50%に阻止されたときの試料希釈液のIFN力価を1単位(IU)とし、ヒトINF- α 標準品(ミドリ十字社製)の力価をもとに(Gal)₃-INF- α 及びINF- α のIFN生物活性を算出した。

その結果、(Gal)₃-INF- α 、INF- α の生物活性はそれぞれ 1.17×10^8 IU/mg、及び、 1.42×10^8 IU/mgであった。よって(Gal)₃-INF- α の未修飾INF- α に対する比活性は82%であり、修飾体はINF- α (2b)の生物活性を保持していることが示された。

実施例 10 修飾体の肝臓集積性

マウス (C57BL/6、CRJ社、6W、♂) に (Gal)₃-rhIL-2、(GalNAc)₃-rhIL-2、アシアロオロソムコイド (ASOR、Biderらの方法 (Eur. J. Biochem., (1995), 230, 207-212) に従いヒトオロソムコイド (OR or α 1-acid glycoprotein、Sigma社製より調製) 及び rhIL-2 を 3.2 nmol/kg で静脈内投与し、一定時間後 (2分、15分、30分、60分)、採血及び肝臓の採取を行った。血漿は常法により採取し、検体濃度を ELISA により測定した。肝臓は 0.1% BSA 含有 PBS (-) の 9 倍量を添加してホモジナイズし、3000 rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を ELISA 用バッファー (0.05 M Tris HCl、1 mM MgCl₂、0.15 M NaCl、0.05% (V/V)、Tween 20、0.02% (W/V) NaN₃、1% (W/V) BSA、pH 8.1) で希釈し ELISA で肝臓中濃度を測定した。

なお、IL-2 の ELISA は一次抗体として抗ヒト IL-2 マウスモノクローナル抗体 (ペーリンガーマンハイム社製)、二次抗体として調製した抗ヒト IL-2 ウサギポリクローナル抗体、三次抗体としてはアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG (γ +L) ポリクローナル抗体 (ヤギ) (TAGO社製) を用いて行った。一方、ASOR の ELISA は一次抗体として精製抗ヒト α 1-acid glycoprotein ヒツジポリクローナル抗体 (Binding Site社製)、二次抗体として精製抗ヒト α 1-acid glycoprotein ウサギポリクローナル抗体、三次抗体としてはアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG (γ +L) ポリクローナル抗体 (ヤギ) (TAGO社製) を用いて行った。

その結果、第5図のように血漿中の (Gal)₃-rhIL-2、(GalNAc)₃-rhIL-2 濃度は rhIL-2 に比べ低い推移を示したのに対し、肝臓中濃度は (Gal)₃-rhIL-2、(GalNAc)₃-rhIL-2 がはるかに高く推移し、(Gal)₃ 及び (GalNAc)₃ 修飾により IL-2 の肝臓への集積が可能であることが示された。(Gal)₃-rhIL-2 及び (GalNAc)₃-rhIL-2 の肝臓中における AUC (臓器中濃度-時間曲線下面積)

はrhIL-2のそれぞれ3.5倍、6.2倍であった。またASORについては、血漿中濃度は投与直後の濃度は高いもののすぐに消失したのに対し、肝臓中濃度は(Gal)₃-rhIL-2、(GalNAc)₃-rhIL-2よりもさらに高く推移した。

さらに(Gal)₃-rhIL-2の肝臓集積が人工リガンドである(Gal)₃と肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプター(ASGR)とのBindingによることを証明するため、Biderらの方法(Eur. J. Biochem., (1995), 230, 207-212)にしたがい調製したアシアロオロソムコイド(ASOR)同時投与による集積阻害実験を行った。

マウス(C57BL/6, CRJ社, 6W, ♂)に(Gal)₃-rhIL-2の50μg/kg(IL-2換算)及びASORを1322μg/kg(IL-2の10当量)を同時投与し、2分後採血及び主要臓器(肝臓、腎臓、肺)の採取を行った。各検体濃度をELISAで定量し、同量投与したrhIL-2及び(Gal)₃-rhIL-2と比較した。

その結果、第6図に示すように肝臓における集積量がASOR同時投与によりrhIL-2と同程度に低下し、(Gal)₃-rhIL-2の肝集積がASGRを介したものであることが確認された。

また、(Gal)₃-INF-αについても同様にASOR同時投与による肝臓への集積阻害実験を行った。マウス(C57BL/6)に(Gal)₃-INF-αの50μg/kg(INF換算)及びASORを1051μg/kg(10当量)を同時投与し、2分後採血及び主要臓器(肝臓、腎臓)の採取を行った。各検体濃度をELISAで定量し、INF-α及び(Gal)₃-INF-αの濃度と比較した。

その結果、第7図に示すように(Gal)₃-rhIL-2と同様(Gal)₃-INF-αについても、肝臓への集積量が未修飾INF-αの6倍程度に増加した。さらに肝臓における集積量が、ASOR同時投与により未修飾INF-αと同程度に低下し、本集積がASGRを介したものであることが示された。

一方、PEG12, (Gal)₃-rX2-IL-2の体内動態についても同様

にマウス (C57BL/6, CRJ社, 6W, ♂) に検体を $33 \mu\text{g}/\text{kg}$ (IL-2換算) で静脈内投与し、一定時間後 (2分、15分、60分)、採血及び肝臓の採取を行った。血漿は常法により採取し、検体濃度をELISAにより測定した。肝臓は0.1%BSA含有PBS (-) を9倍量添加しホモジナイズし、 3000 rpm で5分間遠心分離した後、上清を前記ELISA用バッファーで希釈しELISAで組織中濃度を測定し、投与量当たりの割合で比較した。

その結果、第8図のように血漿中濃度はrhIL-2に比べ高い推移を示した。肝臓中濃度は (Gal) - rhIL-2よりさらに高く推移し、AUC (臓器中濃度-時間曲線下面積) はrhIL-2の約12倍であった。

実施例11 修飾体の肝細胞結合試験

修飾体の肝細胞結合試験はBerryらの方法 (M.N.Berry et. al., J.Cell Biol., 43, 506-520 (1969)) を改良したコラゲナーゼ還流法により調製したマウス分離肝細胞を用いて行った。即ち、マウス (C57BL/6, 7W, ♂) 7匹をそれぞれコラゲナーゼ (タイプI、和光純薬社製) により還流後、肝臓の各葉を切断した。各肝臓を細胞ろ過器でろ過後、低速遠心操作 ($50 \text{ g} \times 1 \text{ min}$) で集めた肝細胞を、 150 mm の組織培養用Dish (岩城硝子社製) を用い、10%FBS入りD-MEM培地 (Gibco社製、 $100 \text{ U}/\text{mL}$ ペニシリン、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシン含有) にて 37°C の CO_2 インキュベーター ($5\% \text{ CO}_2$) にて、1~4時間培養した。ディッシュ面に接着した細胞のみをコラゲナーゼで処理後、ひとまとめにして3回の低速遠心操作 ($50 \text{ G} \times 1 \text{ min}$) により肝実質細胞を精製した (合計 1.1×10^8 個、Bioavailability 93%)。6wellのコラゲナーゼコートプレート上、 8×10^5 個/wellの肝実質細胞を、上記10%FBS入りD-MEM培地中、 37°C で一晩培養し結合試験に用いた。

肝細胞結合試験はChangらの方法 (T.Chang et al., BBA 942, 57-64 (1988)) に従って行った。ほぼconfluentな状態となった細胞を 10 mM CaCl_2 含有D-PBSで2回洗浄後、0.1%BSAを含む該緩衝液を添加し 4°C で、30分インキュベートした。クロラミンT法により ^{125}I ラベルした種

々の濃度の (Gal)₃-Tyr-Boc (1.80×10^5 cpm/mg)、
 (GalNAc)₃-Tyr-Boc (1.49×10^5 cpm/mg)、
 ASOR (3.16×10^6 cpm/ μ g) (0.1% BSAを含む該緩衝
 液中に溶解) 1 mLを添加し、4℃で2時間インキュベートした。一方、非特異
 的な結合については該ラベル溶液中にそれぞれ87.5 mMのN-アセチルガラ
 クトサミン (Sigma社製) を添加して行った。インキュベートした各細胞は、
 4℃中冷却したD-PBSで2回洗浄後、プレートを-20℃で30分以上放置
 後、0.5% SDSを含む0.1N NaOH溶液1 mlによる溶解液のうち0.
 8 mlの放射能から非特異的な結合による分を差し引き、全量に換算したものを
 結合画分とした。結合試験は各ポイントn=2で行った。また、細胞の総蛋白質
 量は該溶解液0.1 mlよりLorrey法により算出した。

〔結合量〕 (pmol/mg cell protein) に対する〔結合量
 /非結合量〕 (L/mg cell protein) を、Scatchard
 plotした結果、すべての検体でplotが双曲線状となり2種類の結合が
 あることがわかった。結合部位が2種類有り、それぞれが相互作用がないとして
 Gauss-Newton法を用いた最小自乗法を応用したScatchard
 解析を行い各検体の高親和性の解離定数 (Kd1) を比較した結果、ASOR
 のKd が約0.8 nMであるのに対し、(Gal)₃-Tyr-Boc、(GalNAc)₃-Tyr-Bocのそれはそれぞれ数十nMのオーダーレベルであり、
 (GalNAc)₃-Tyr-Bocのそれの方が(Gal)₃-Tyr-Boc
 よりもより低かった。この結果、合成した2種人工リガンドは天然糖鎖型リガン
 ドを持つASORに比べ、2オーダー程度ASGRに対する結合親和性が低く、
 その強さはASOR ≫ (GalNAc)₃ > (Gal)₃ の順であることがわかつ
 た。

実施例 12 修飾体の肝細胞取り込み

修飾体の肝細胞結合試験は結合試験と同様にマウス (C57BL/6, 9W,
 ♂) 3匹をコラゲナーゼ還流し、低速遠心により精製した肝実質細胞 (計 6.0
 $\times 10^7$ 個、Bioavailability 92%) を6wellのこ

ラゲナーゼコートプレート上、 6×10^5 個/well で 10% FBS 入り D-MEM 培地 (Gibco 社製、100 U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、50 μ g/mL ゲンタマイシン含有) 中、37°C、5% CO₂ 中で一晩培養したものを用いた。

肝細胞取り込み試験も Chang らの方法 (T. Chang et al., BBA 942, 57-64 (1988)) を参考にして行った。ほぼ confluent な状態となった細胞を 0.1% BSA、10 mM HEPES 入り D-MEM 培地 (pH 7.4) で 1 回洗浄後、該緩衝液を添加し、37°C、5% CO₂ 中で 30 分インキュベートした。クロロミン T 法により ¹²⁵I ラベルした 24 nM の (Gal)₃-rhIL-2 (1.14×10^7 cpm/ μ g (IL-2 換算))、(GalNAc)₃-rhIL-2 (1.09×10^7 cpm/ μ g (IL-2 換算)) 及び ASOR (3.16×10^6 cpm/ μ g) (該緩衝液中に溶解) 1 mL を添加し、37°C で一定時間 (0 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間) インキュベートした。一方、非特異的な取り込みについては該ラベル溶液中にそれぞれ 100 mM の N-アセチルガラクトサミンを添加して行った。インキュベートした各プレートは反応後氷浴上に移し、培地の一部をサンプリングした後、4°C 中冷却した 20 mM EGTA 入り D-PBS 溶液 (Ca²⁺、Mg²⁺ を含まず) を添加し 5 分間放置することによる洗浄を 2 回繰り返し、さらに冷却した D-PBS 溶液 (Ca²⁺、Mg²⁺ を含まず) で 1 回洗浄後、プレートを -20°C で、30 分以上放置した。各 well の 0.5% SDS を含む 0.1 N NaOH 溶液 1 mL による溶解液のうち 0.8 mL の放射能から非特異的な取り込みによる分を差し引き全量に換算したものを取り込み画分量とした。一方、培地中の総トリクロロ酢酸可溶化画分の放射能から非特異的な分解による分を差し引いたものを分解画分とした。取り込み試験は各ポイント n=3 で行った。また細胞の総蛋白質量は該溶解液 0.1 mL について Lorry 法により算出した。

その結果、第 9 図 (A) のように ASOR は、インキュベート 30 分より取り込み成分が観察され、1 時間で飽和に達した。また分解成分は時間経過にともない徐々に増加し、その量は 4 時間後が最も高かった。

一方、(Gal)₃-rhIL-2 は、第 9 図 (C) のように取り込み及び分解

成分がほとんど観察されず、ASORに比べ肝実質細胞に取り込まれにくいことが示された。この結果、肝実質細胞に特異的に存在するASGRに対するリガンドの結合親和性を2オーダー程度低下させることにより、その修飾体は静脈内投与によりレセプターを認識して肝臓へは集積できるものの、肝実質細胞へは取り込まれにくい性質を付与しうることが示された。

(GalNAc)₃-rhIL-2は、第9図(B)のように、比較的短時間で取り込まれることがわかった。先の実験から明らかなように(GalNAc)₃-rhIL-2はASGRに対する親和性は低いので、肝臓に選択的に達し、比較的早期に代謝されることが望ましい薬剤のDDS製剤に好ましいことがわかった。

実施例13 修飾体の抗腫瘍効果

実験は線維肉腫(S908, D2, vp2)を肝移植(7.5×10^4 cell / mouse)したマウス(B10D2, 6W, ♀)を用い、移植後7日目より(Gal)₃-rhIL-2及びrhIL-2を計5回($0.5 \mu\text{g}/\text{shot}$)静脈内投与し($n=4$)、28日目に解剖検査を行った。その結果、第10図に示すようにrhIL-2投与群に比べ(Gal)₃-rhIL-2投与群は著しい腫瘍の縮小が観察され、(Gal)₃-rhIL-2はrhIL-2に対し抗腫瘍効果が増強されていることが示された。

実施例14 修飾体の毒性

実験はマウス(B10D2, 6W, ♀)を用い、(Gal)₃-rhIL-2及びrhIL-2を一日2回5日間連続($1.5 \mu\text{g}/\text{day}$, $4.4 \mu\text{g}/\text{day}$, $13.3 \mu\text{g}/\text{day}$, $40 \mu\text{g}/\text{day}$ 、濃度は全てIL-2換算)静脈内投与し($n=3$)、最終投与2時間後に解剖検査を行った。評価項目としては肝臓、肺及び腎臓の臓器重量(湿重量)の測定と血清を採取して富士ドライケムによる血液生化学試験を行った。

その結果、第11図に示すように肺での(Gal)₃-rhIL-2の臓器重量%(W/W)の増加は同じ投与量のrhIL-2に比べ低い傾向を示し、 $40 \mu\text{g}/\text{day}$ 投与群においてrhIL-2はコントロールである生理食塩水投与群

に比べ有意な増加が観察されたのに対し、(Gal)₃-rhIL-2では有意な増加が観察されなかった。一方、肝臓においては(Gal)₃-rhIL-2、rhIL-2ともに投与量の増加にともない臓器重量%の増加が観察され、40 μ g/day投与群においてrhIL-2、(Gal)₃-rhIL-2ともにコントロールである生理食塩水投与群に比べ有意な増加が観察されたものの、両者に大きな違いは見られなかった。さらに腎臓においては (Gal)₃-rhIL-2、rhIL-2ともに投与量を増加させても臓器重量の増加が見られなかった。

一方、血液生化学検査の結果、第12図に示すように、GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)、GPT (glutamic pyruvic transaminase)、TBIL-S (total bilirubin) では投与量の増加にともない、(Gal)₃-rhIL-2、rhIL-2ともに増加が観察されたが、rhIL-2の方が高い値を示す傾向にあった。一方、TP-S (total protein)、ALB-S (albumin)、BUN-S (blood urea nitrogen) では投与量の増加による観察値の増加は見られなかった。

以上の結果、(Gal)₃-rhIL-2の毒性は肺においてrhIL-2 に比べ低い傾向を示し、肝臓や腎臓においてもその上昇は見られないことから、本発明の修飾体が他の臓器に毒性を与えることなく、肝臓へ集積していることが示された。

請 求 の 範 囲

1. 分子量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ の範囲であって、少なくとも1個のトランスグルタミナーゼの基質となるGln残基を有する生理活性蛋白質と、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオロソムコイドに比べ低く、かつ、トランスグルタミナーゼの基質となるアミノ基及びガラクトース(Gal)基又はN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)基を有するアミノ酸誘導体からなる分岐鎖リガンドとを、微生物由来のトランスグルタミナーゼの存在下に反応せしめて、前記生理活性蛋白質中のグルタミン残基のγ-カルボキシアミド基と前記分岐鎖リガンド中の末端アミノ基との間にアミド結合を形成させることにより製造し得る生理活性蛋白質の修飾体、及び、製薬上許容される担体とを含有してなる肝臓集積性を有する医薬組成物。

2. 分岐鎖リガンドが、次式一般式(I)



(式中、AAは置換基Z又はWのいずれのほうもN-末端であってもよい1個又は2個の塩基性アミノ酸又は酸性アミノ酸を示し、AAが2個のアミノ酸からなるときはα位又はα位以外の位置でアミド結合をしてもよく、

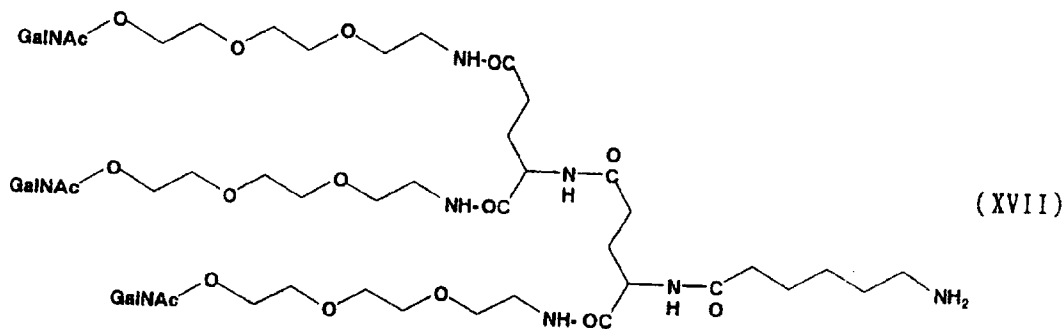
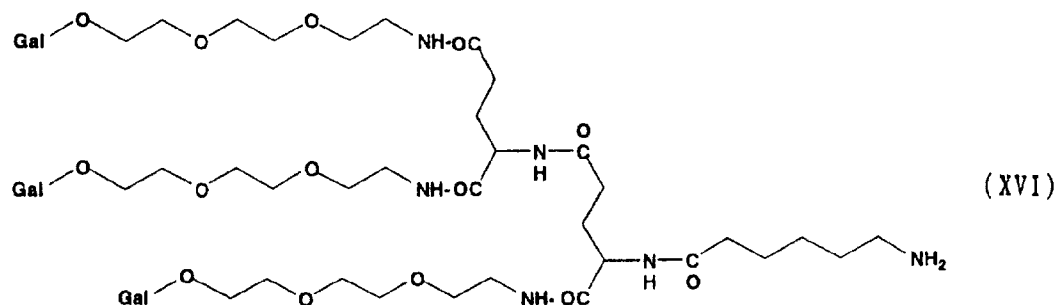
Wは式 $-X^1-(CH_2)_n-NH_2$ (式中、nは1～8の整数であり、 X^1 はWがAAで示されるアミノ酸のアミノ基に結合する場合は $-CO-$ を示し、WがAAで示されるアミノ酸のカルボキシル基に結合する場合は $-NH-$ を示す。)で示されるアルキルアミン誘導体であり、

Zは式 $-X^2-(CH_2CH_2O)_p-R$ 又は式 $-X^2-(CH_2)_q-OR$ (式中、Rはガラクトース(Gal)又はN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)であり、pは1～6の整数であり、qは1～18の整数であり、 X^2 はZがAAで示されるアミノ酸のアミノ基に結合する場合は $-CO-$ を示し、ZがAAで示されるアミノ酸のカルボキシル基に結合する場合は $-NH-$ を示す。)で示されるGalまたはGalNAcを有する基である。)

で示される分枝型Gal又はGalNAcを有するアミノ酸誘導体である請求の範囲第1項に記載の医薬組成物。

3. 一般式 (I) で示される分岐鎖リガンドの基 A A が 1 個又は 2 個の同一又は異なるグルタミン酸又はアスパラギン酸である請求の範囲第 2 項に記載の医薬組成物。

4. 分岐鎖リガンドが、次式 (XVI) 又は (XVII) 、



で示されるリガンドである請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の医薬組成物。

5. 生理活性蛋白質がインターロイキン-2 (IL-2)、インターフェロン- α (INF- α)、又は、それらの誘導体である請求の範囲第 1 項～第 4 項のいずれかに記載の医薬組成物。

6. 請求の範囲第 1 項～第 5 項のいずれかに記載の分岐鎖リガンドで修飾された生理活性蛋白質が、さらに、請求の範囲第 1 項～第 4 項のいずれかに記載の分岐鎖リガンド以外のリガンドを用いて、微生物由来のトランスグルタミナーゼ以外のトランスグルタミナーゼにより修飾された請求の範囲第 1～5 項のいずれかに記載の医薬組成物。

7. 請求の範囲第 1 項～第 4 項のいずれかに記載の分岐鎖リガンド以外のリガ

ドがポリエチレングリコール誘導体であり、微生物由来のトランスグルタミナーゼ以外のトランスグルタミナーゼが動物由来のものである請求の範囲第6項に記載の医薬組成物。

8. 分子量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ の範囲であって、少なくとも1個のトランスグルタミナーゼの基質となるGln残基を有する生理活性蛋白質と、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオロソムコイドに比べ低く、かつ、トランスグルタミナーゼの基質となるアミノ基及びガラクトース (Gal) 基又はN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 基を有するアミノ酸誘導体からなる分岐鎖リガンドとを、微生物由来のトランスグルタミナーゼの存在下に反応せしめて、前記生理活性蛋白質中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と前記分岐鎖リガンド中の末端アミノ基との間にアミド結合を形成させることにより製造し得る、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオロソムコイドに比べ低い肝臓集積性を有する生理活性蛋白質の修飾体。

9. 分岐鎖リガンドが、下記一般式 (I)



(式中、AAは置換基Z又はWのいずれのほうかN-末端であってもよい1個又は2個の塩基性アミノ酸又は酸性アミノ酸を示し、AAが2個のアミノ酸からなるときは α 位又は α 位以外の位置でアミド結合をしてもよく、

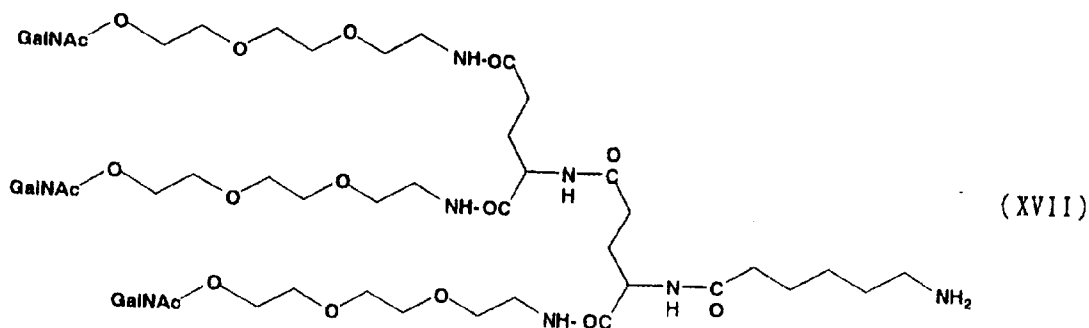
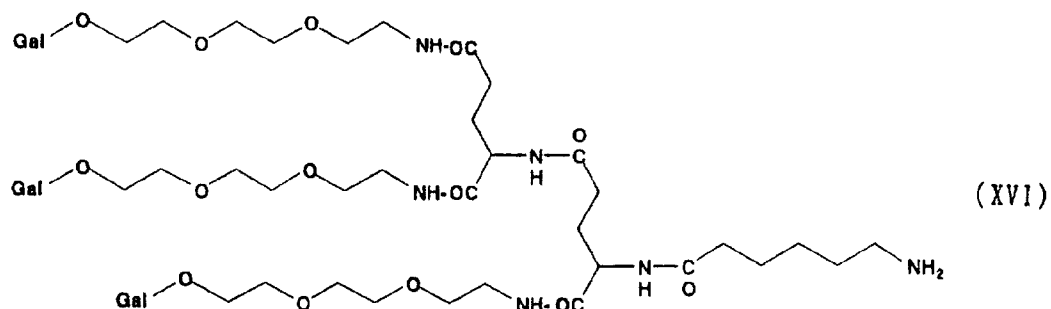
Wは式 $-X^1 - (CH_2)_n - NH_2$ (式中、nは1~8の整数であり、 X^1 はWがAAで示されるアミノ酸のアミノ基に結合する場合は $-CO-$ を示し、WがAAで示されるアミノ酸のカルボキシル基に結合する場合は $-NH-$ を示す。)で示されるアルキルアミン誘導体であり、

Zは式 $-X^2 - (CH_2CH_2O)_p - R$ 又は式 $-X^2 - (CH_2)_q - OR$ (式中、Rはガラクトース (Gal) 又はN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) であり、pは1~6の整数であり、qは1~18の整数であり、 X^2 はZがAAで示されるアミノ酸のアミノ基に結合する場合は $-CO-$ を示し、ZがAAで示されるアミノ酸のカルボキシル基に結合する場合は $-NH-$ を示す。)で示されるGalまたはGalNAcを有する基である。)

で示される分枝型Galまたは分枝型GalNAcを有するアミノ酸誘導体である請求の範囲第8項に記載の生理活性蛋白質の修飾体。

10. 一般式 (I) で示される分岐鎖リガンドの基 AA が 1 個又は 2 個の同一又は異なるグルタミン酸又はアスパラギン酸である請求の範囲第 9 項に記載の生理活性蛋白質の修飾体。

11. 分岐鎖リガンドが、次式 (XVI) 又は (XVII)、



で示されるリガンドである請求の範囲第8項～第10項のいずれかに記載の生理活性蛋白質の修飾体。

12. 生理活性蛋白質がインターロイキン-2 (IL-2)、インターフェロン- α (INF- α)、又は、それらの誘導体である請求の範囲第8項~第11項のいずれかに記載の生理活性蛋白質の修飾体。

13. 請求の範囲第8項～第12項のいずれかに記載の分岐鎖リガンドで修飾された生理活性蛋白質が、さらに、請求の範囲第8～11項のいずれかに記載の分岐鎖リガンド以外のリガンドを用いて、微生物由来のトランスグルタミナーゼ以外のトランスグルタミナーゼにより修飾された請求の範囲第8～12項のいずれ

かに記載の生理活性蛋白質の修飾体。

14. 請求の範囲第8項～第11項のいずれかに記載の分岐鎖リガンド以外のリガンドがポリエチレングリコール誘導体であり、微生物由来のトランスグルタミナーゼ以外のトランスグルタミナーゼが動物由来のものである請求の範囲第13項に記載の生理活性蛋白質の修飾体。

15. 分子量が $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ の範囲であって、少なくとも1個のトランスグルタミナーゼの基質となるGln残基を有する生理活性蛋白質と、肝実質細胞表面に存在するアシアロ糖蛋白質レセプターに対する結合親和性がアシアロオリソムコイドに比べ低く、かつ、トランスグルタミナーゼの基質となるアミノ基及びガラクトース(Gal)基又はN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)基を有するアミノ酸誘導体からなる分岐鎖リガンドとを、微生物由来のトランスグルタミナーゼの存在下に反応せしめて、前記生理活性蛋白質中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基と前記分岐鎖リガンド中の末端アミノ基との間にアミド結合を形成させてなる、請求の範囲第8項～第14項のいずれかに記載の生理活性蛋白質の修飾体の製造方法。

16. 分岐鎖リガンドが、下記一般式(I)



(式中、AAは置換基Z又はWのいずれのほうもN-末端であってもよい1個又は2個の塩基性アミノ酸又は酸性アミノ酸を示し、AAが2個のアミノ酸からなるときは α 位又は α 位以外の位置でアミド結合をしていてもよく、

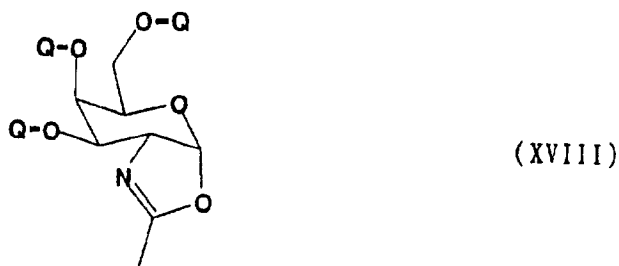
Wは式 $-X^1-(CH_2)_n-NH_2$ (式中、nは1～8の整数であり、 X^1 はWがAAで示されるアミノ酸のアミノ基に結合する場合は $-CO-$ を示し、WがAAで示されるアミノ酸のカルボキシル基に結合する場合は $-NH-$ を示す。)で示されるアルキルアミン誘導体であり、

Zは式 $-X^2-(CH_2CH_2O)_p-R$ 又は式 $-X^2-(CH_2)_q-OR$ (式中、Rはガラクトース(Gal)又はN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)であり、pは1～6の整数であり、qは1～18の整数であり、ZがAAで示されるアミノ酸のアミノ基に結合する場合は $-CO-$ を示し、 X^2 はZがAAで示されるアミノ酸のカルボキシル基に結合する場合は $-NH-$ を示す。)

で示されるGalまたはGalNAcを有する基である。)

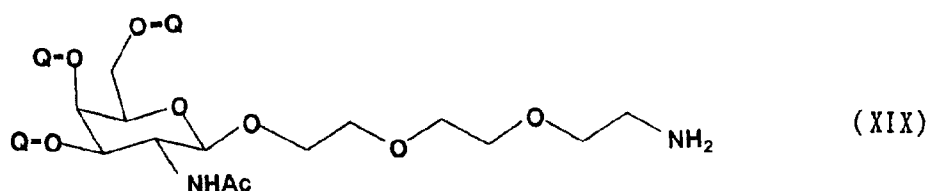
で示される分枝型Galまたは分枝型GalNAcを有するアミノ酸誘導体である請求の範囲第15項に記載の生理活性蛋白質の修飾体の製造方法。

17. 必要に応じて水酸基が保護されている次式(XVIIII)



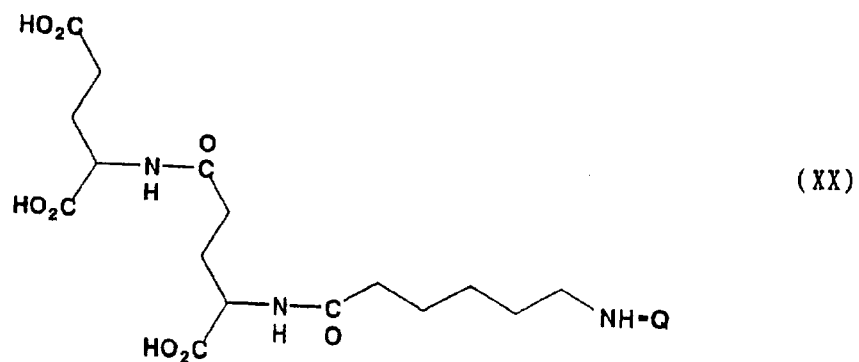
(式中、Qは、水素原子又は水酸基の保護基を示す。)

で示される化合物と、アミノ基が保護された2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エタノールとを、縮合剤の存在下に反応させて、必要により保護基を脱離させて、次式(XIX)



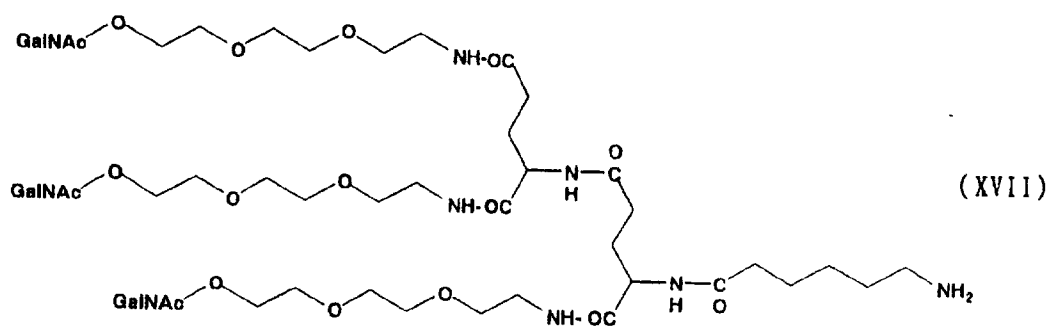
(式中、Qは、水素原子又は水酸基の保護基を示す。)

で示される化合物を製造し、次いで式(XIX)で示される化合物と、次式(X)



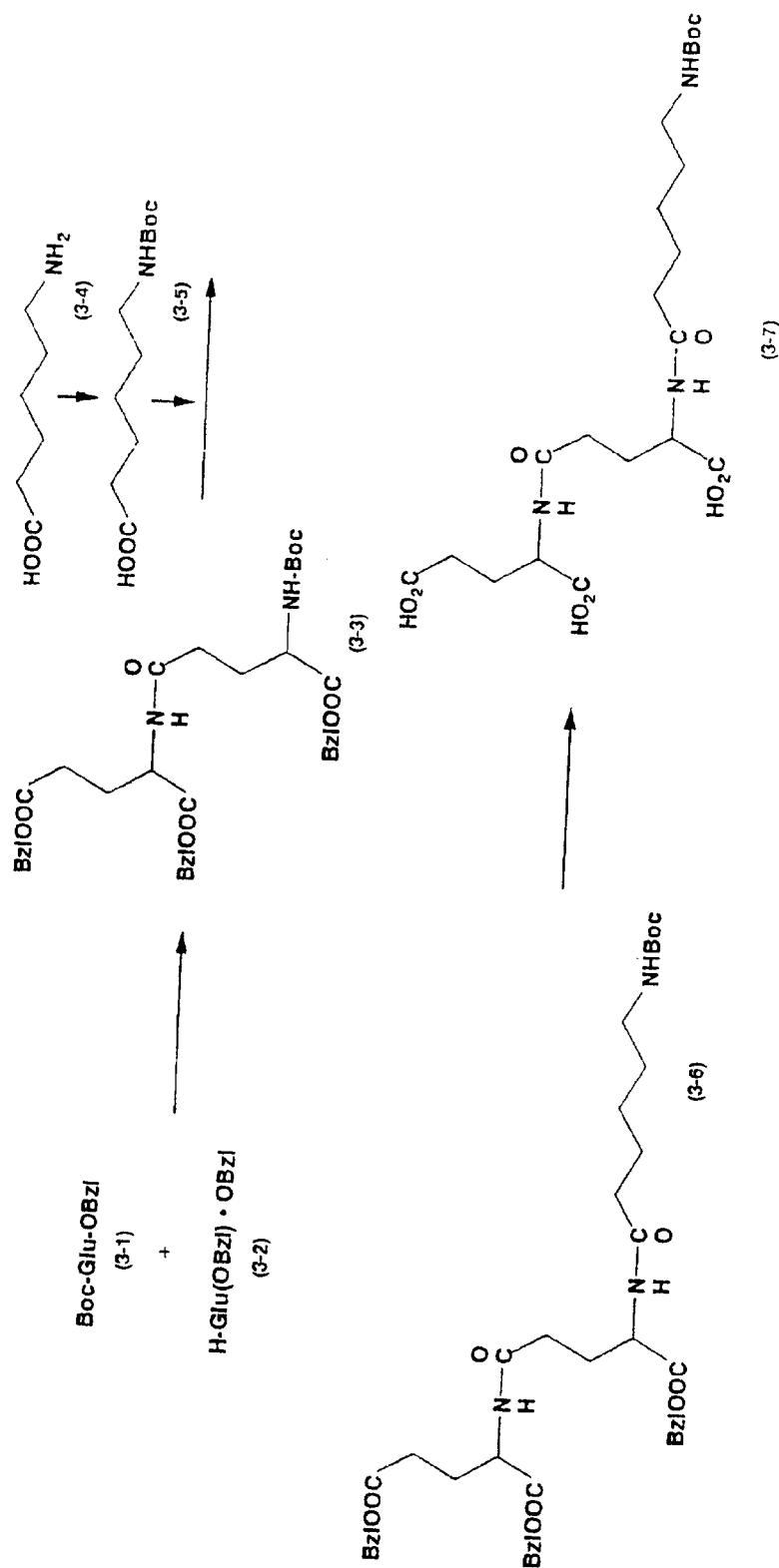
(式中、Qは、水素原子又はアミノ基の保護基を示す。)

で示される化合物とを、縮合剤の存在下に縮合させ、必要に応じて保護基を脱離させることからなる次式 (XVII)

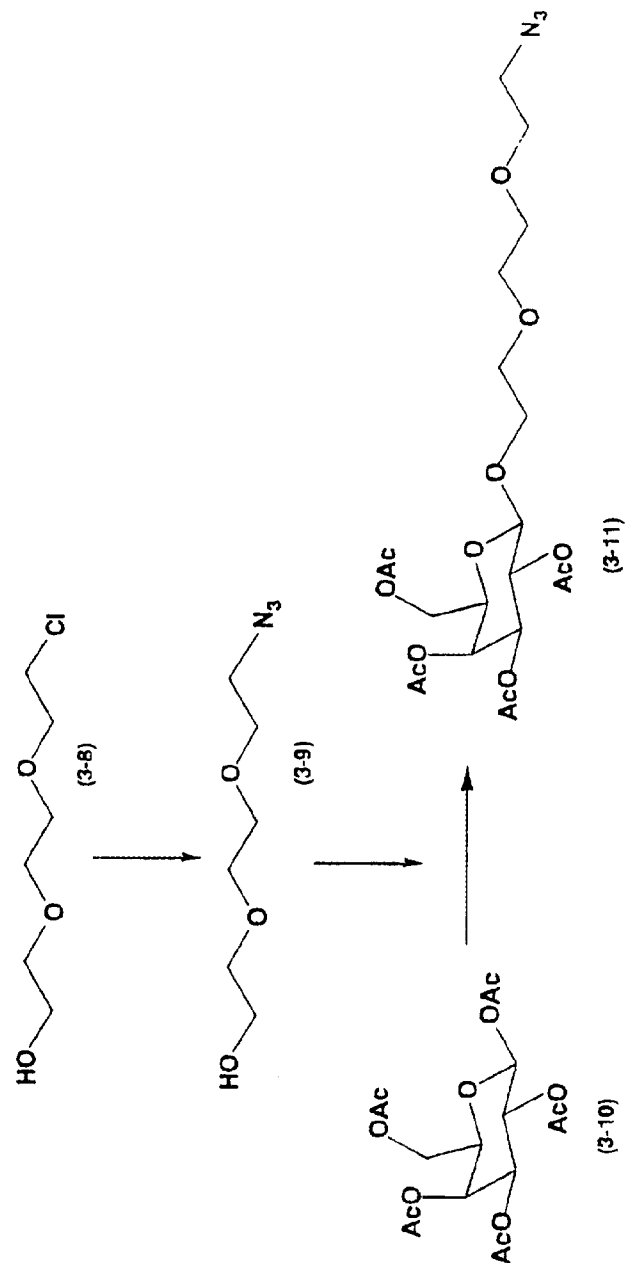


で示されるリガンドを製造する方法。

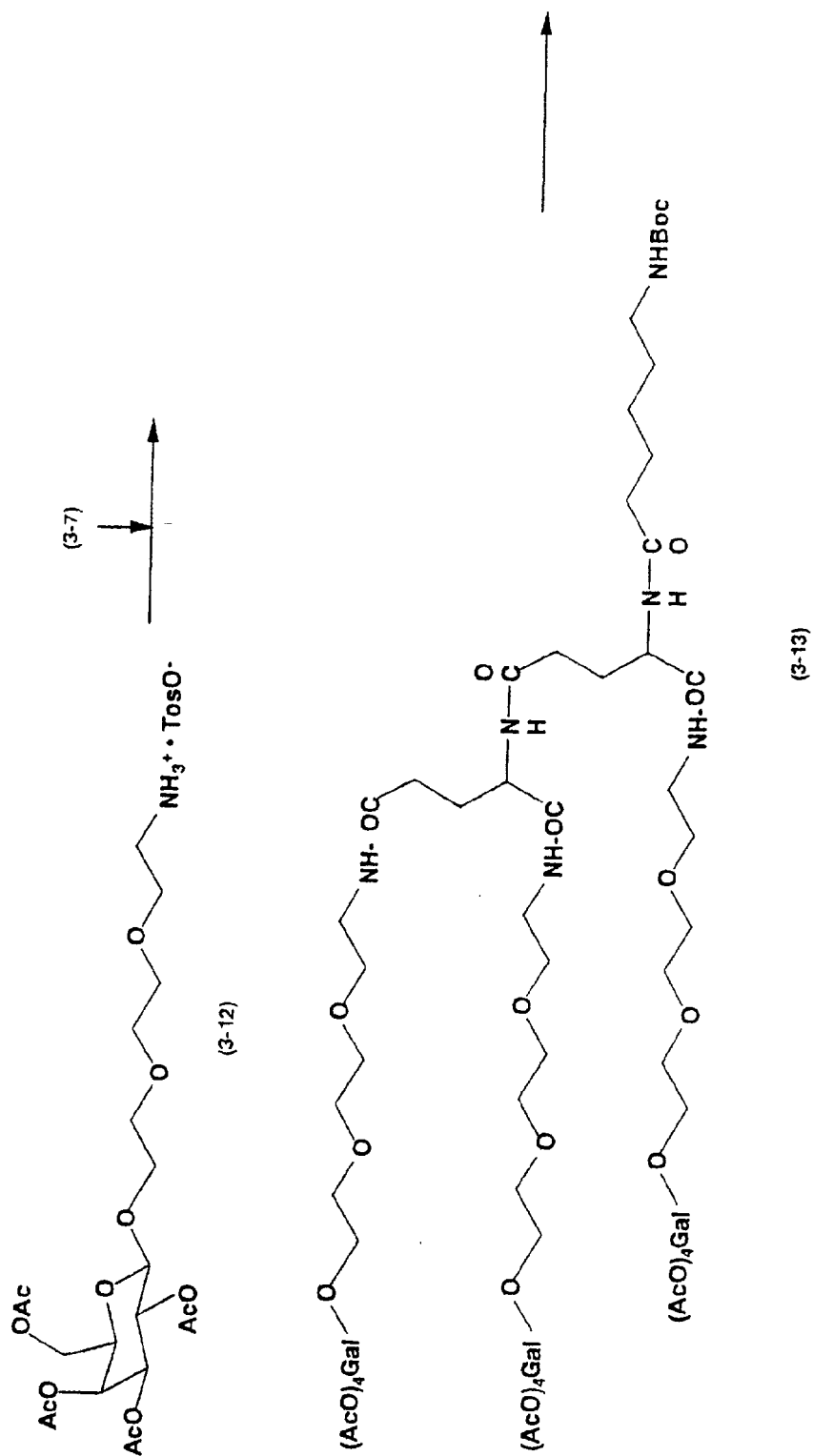
第 1 図 a



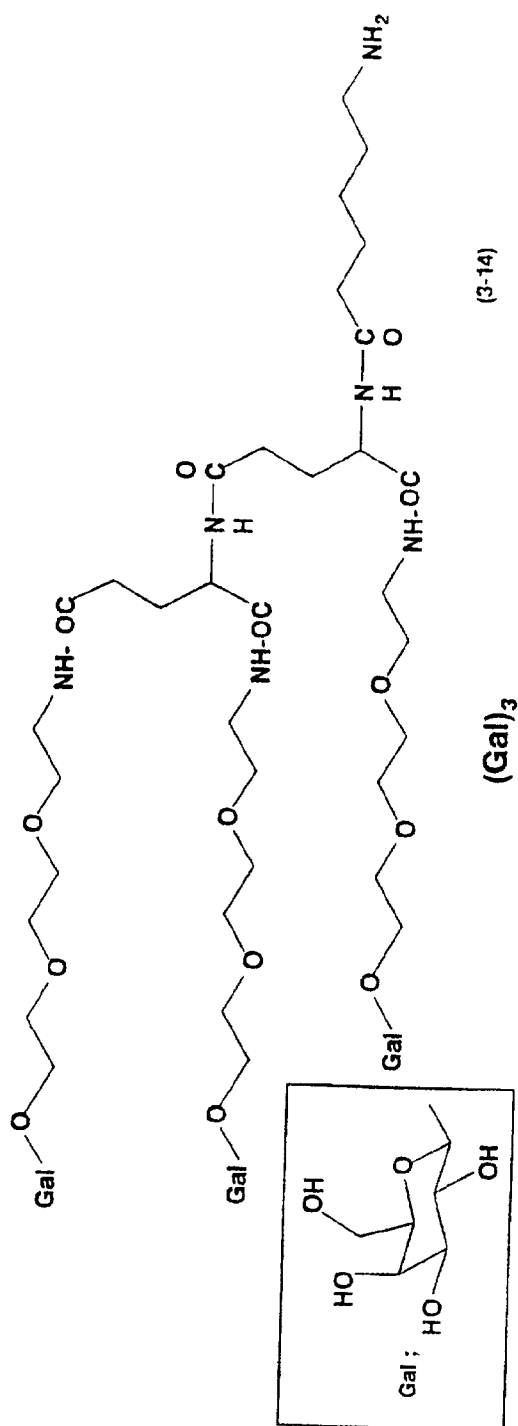
第 1 図 b



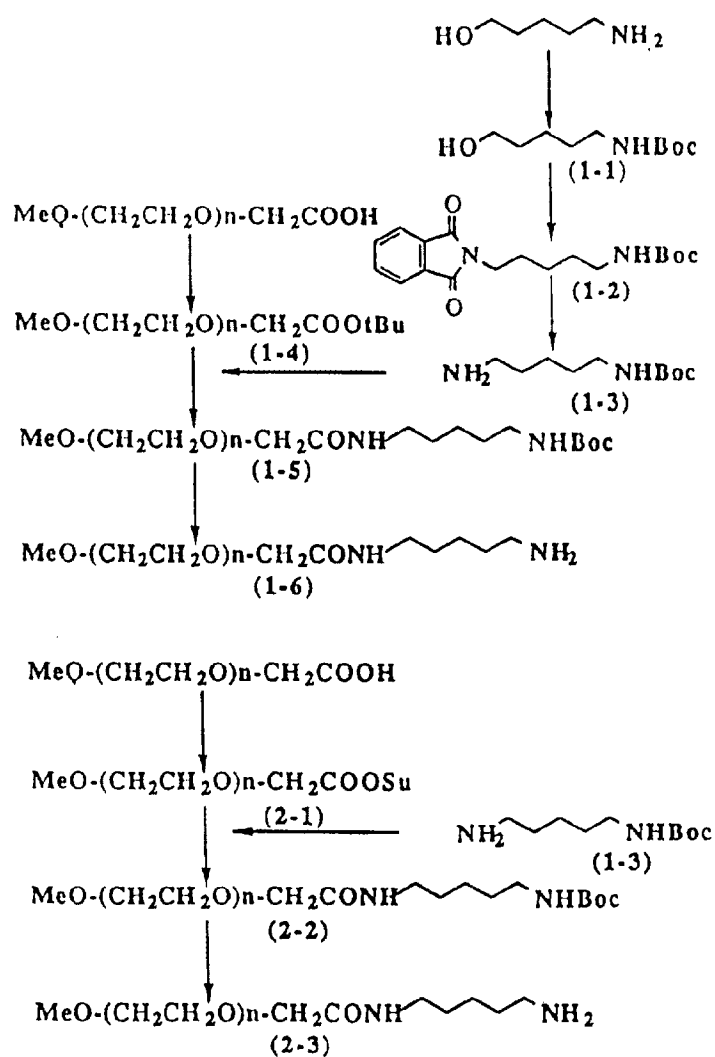
第 1 図 c



第 1 図 d

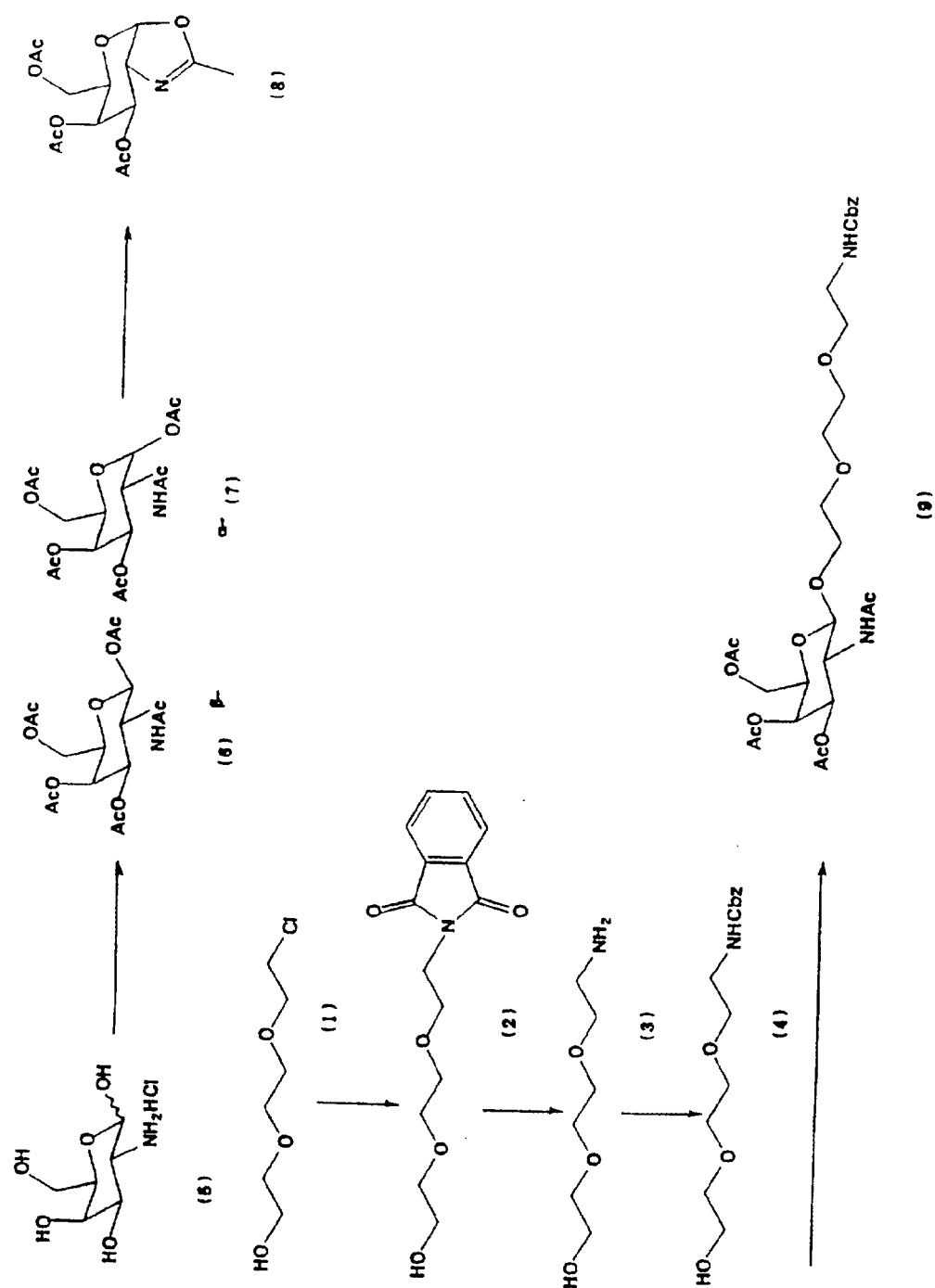


第 2 図

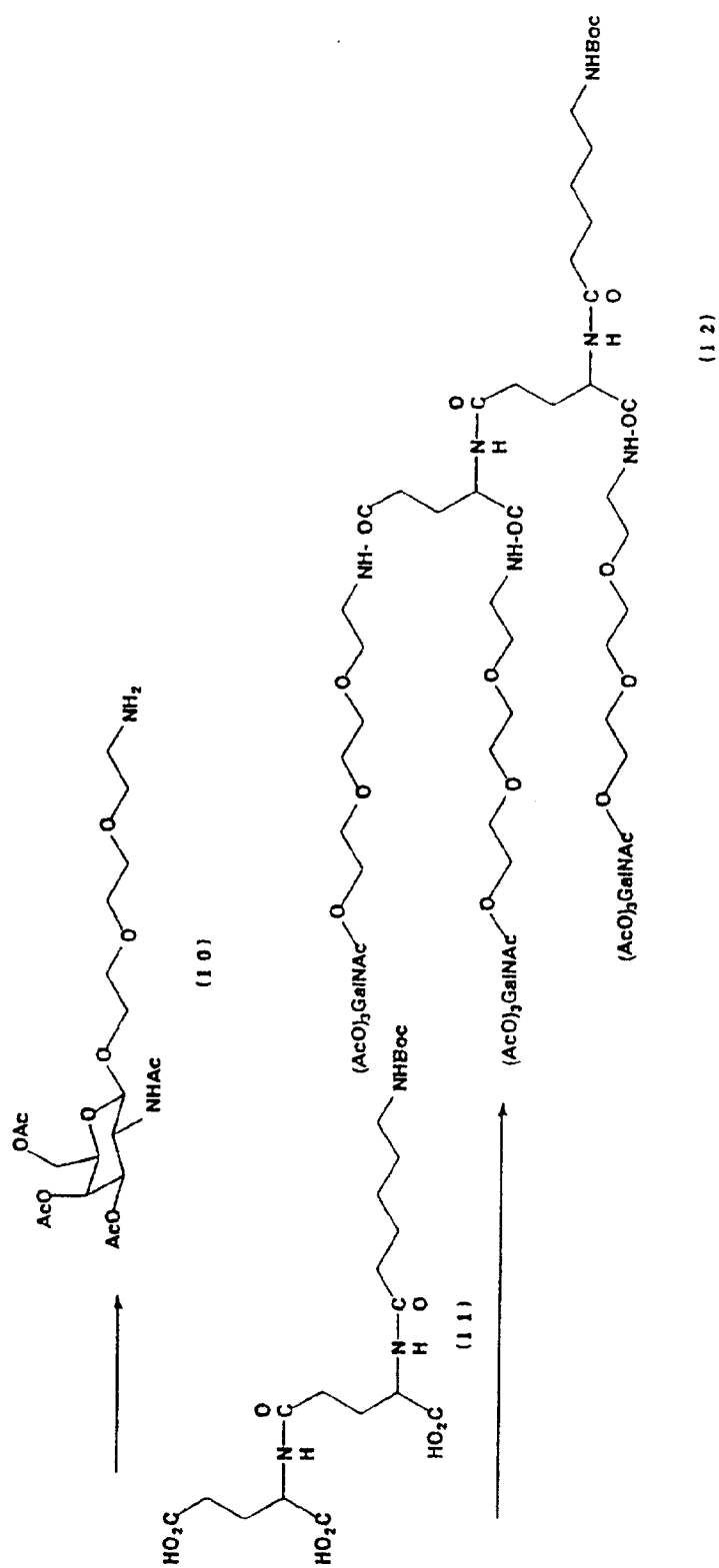


PEG12

第3図 a

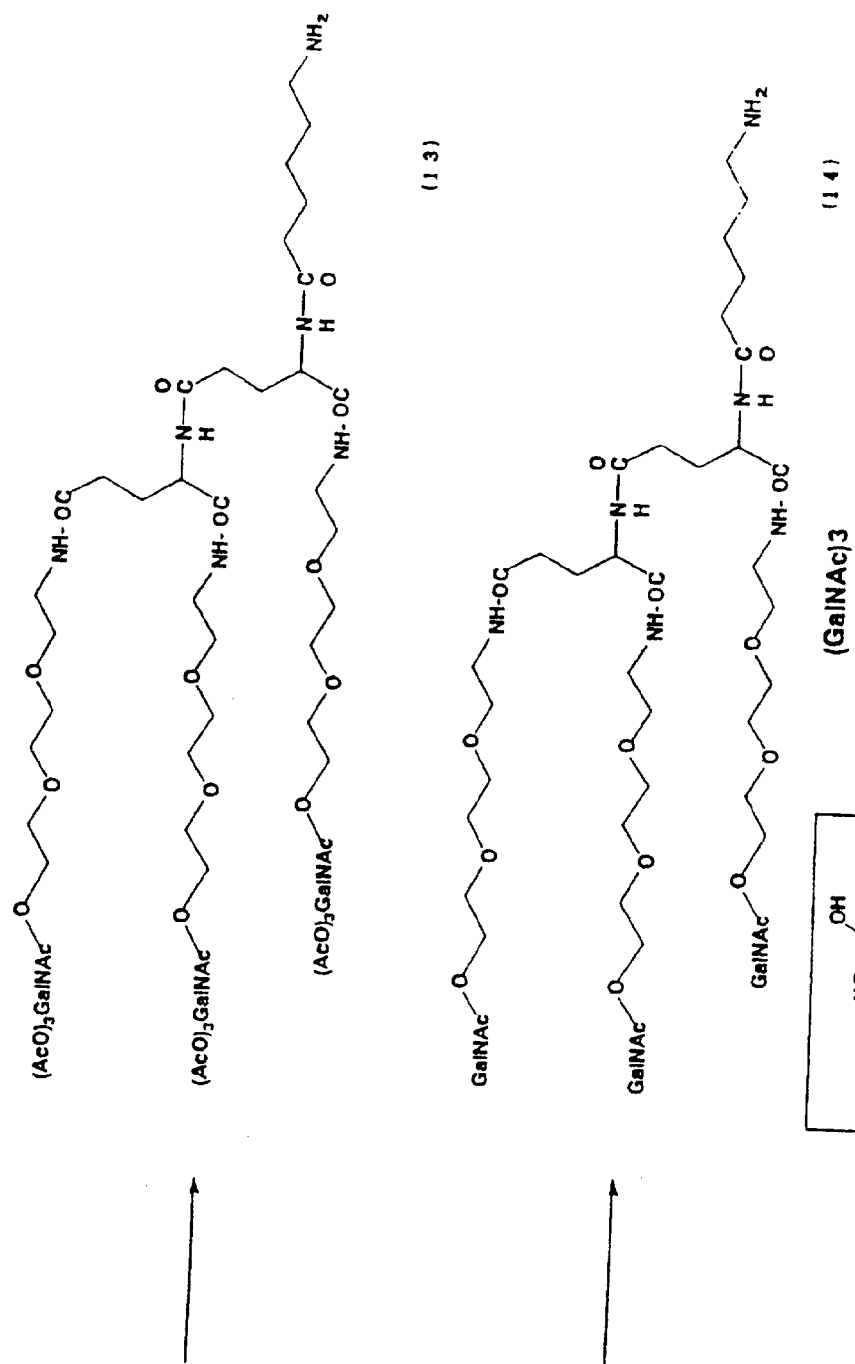


第 3 図 b

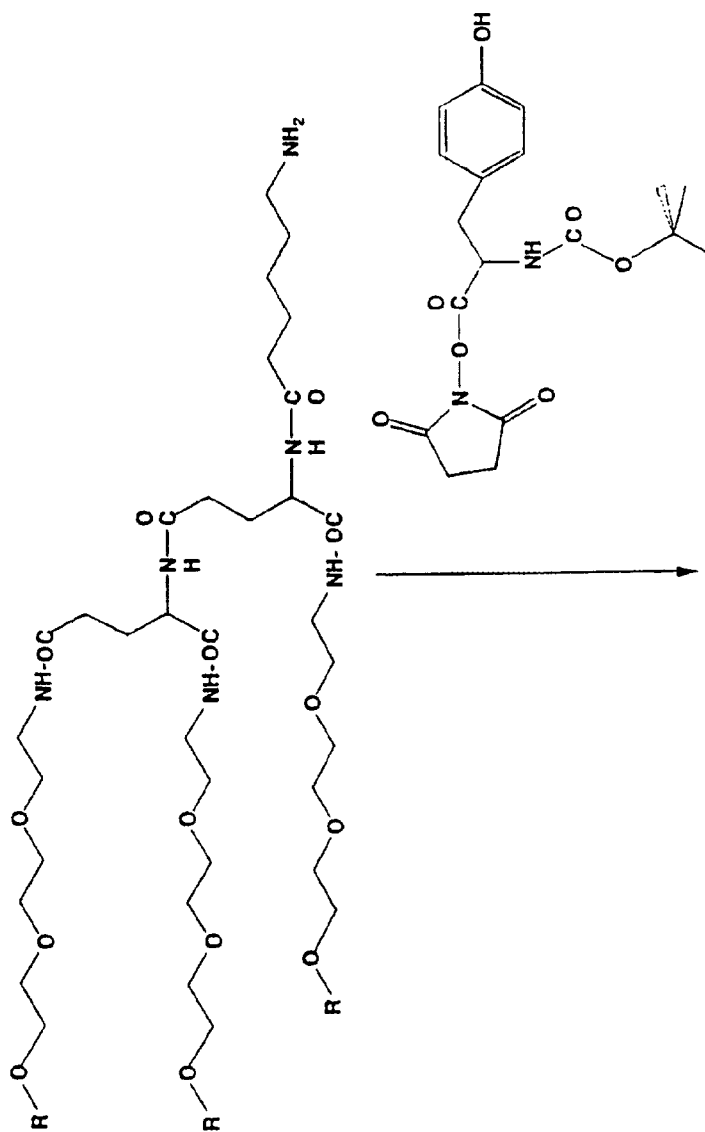


3 / 1 / 1 3

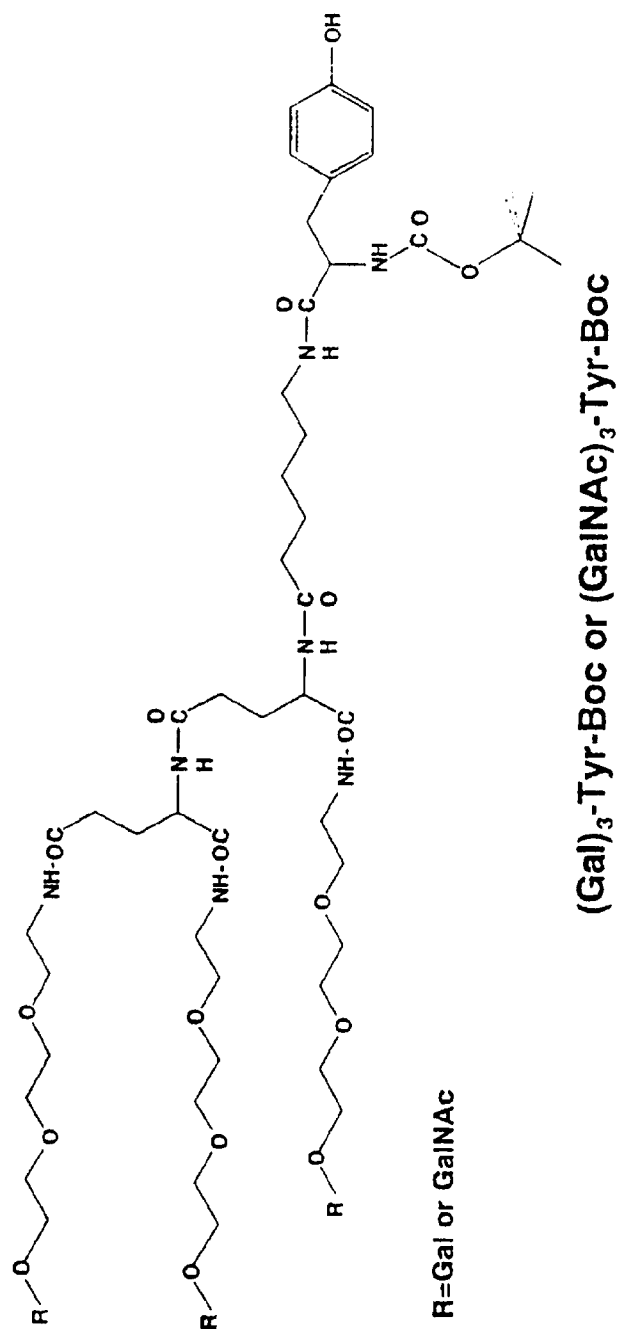
第3図c



第 4 图 a

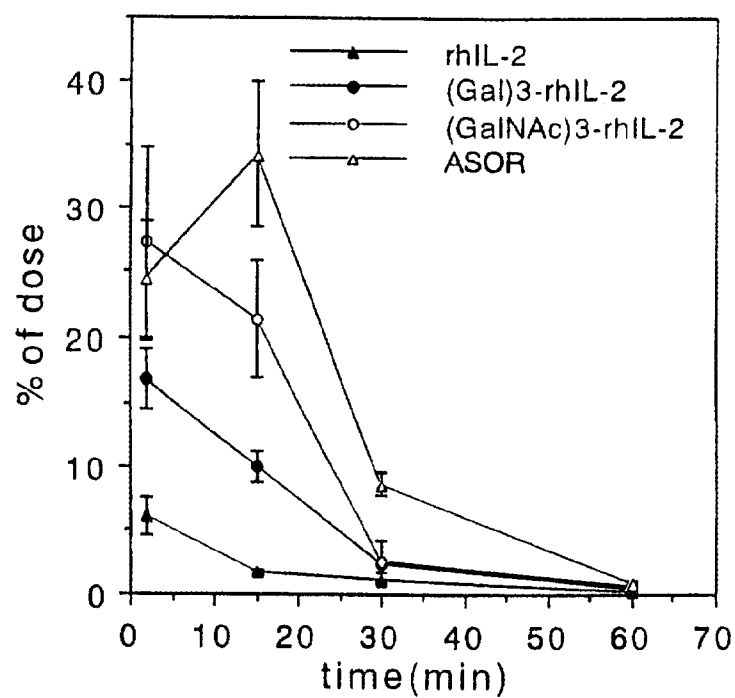


第 4 図 b

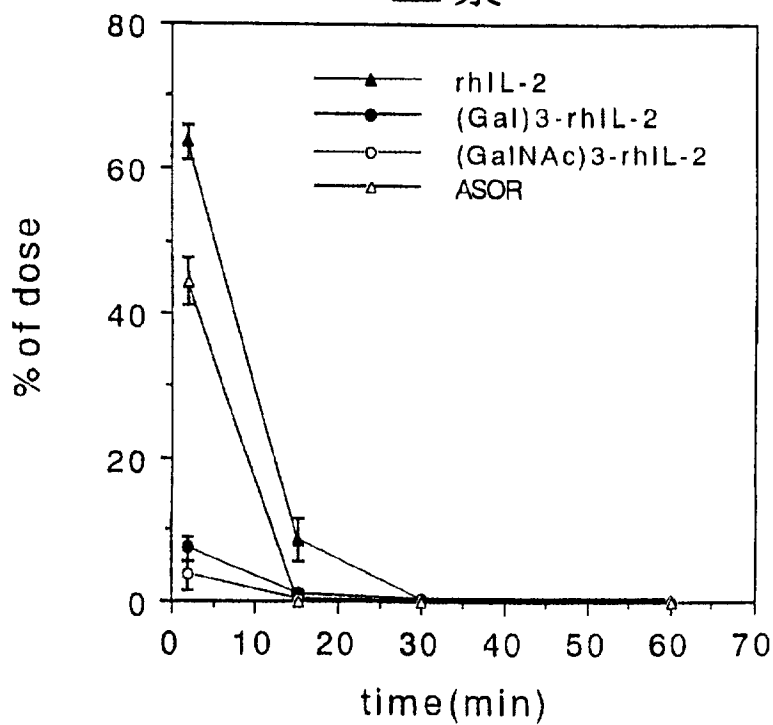


第 5 図

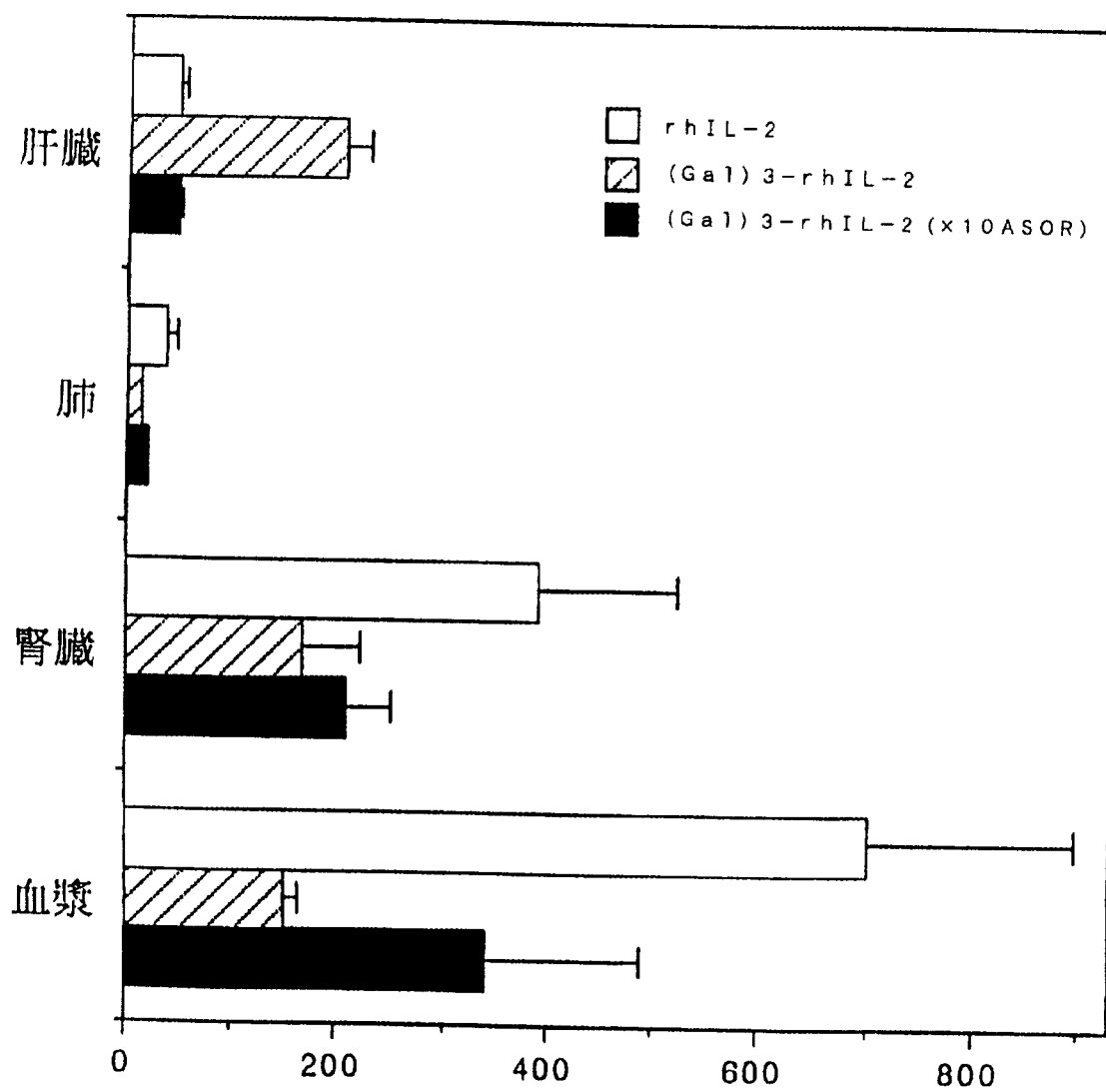
肝臓



血漿

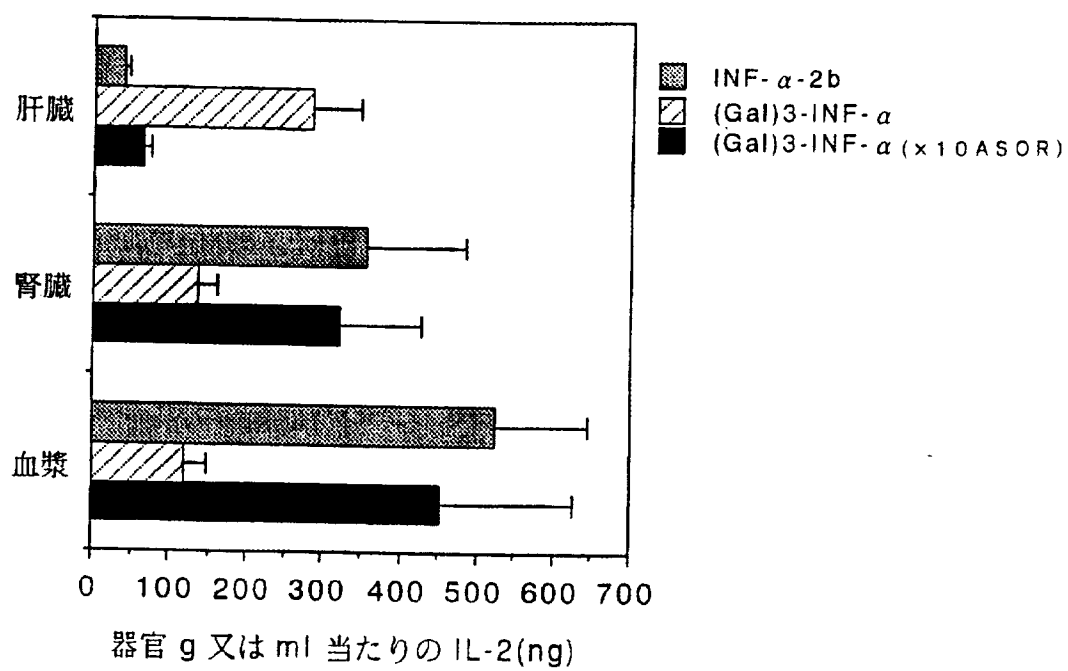


第 6 図

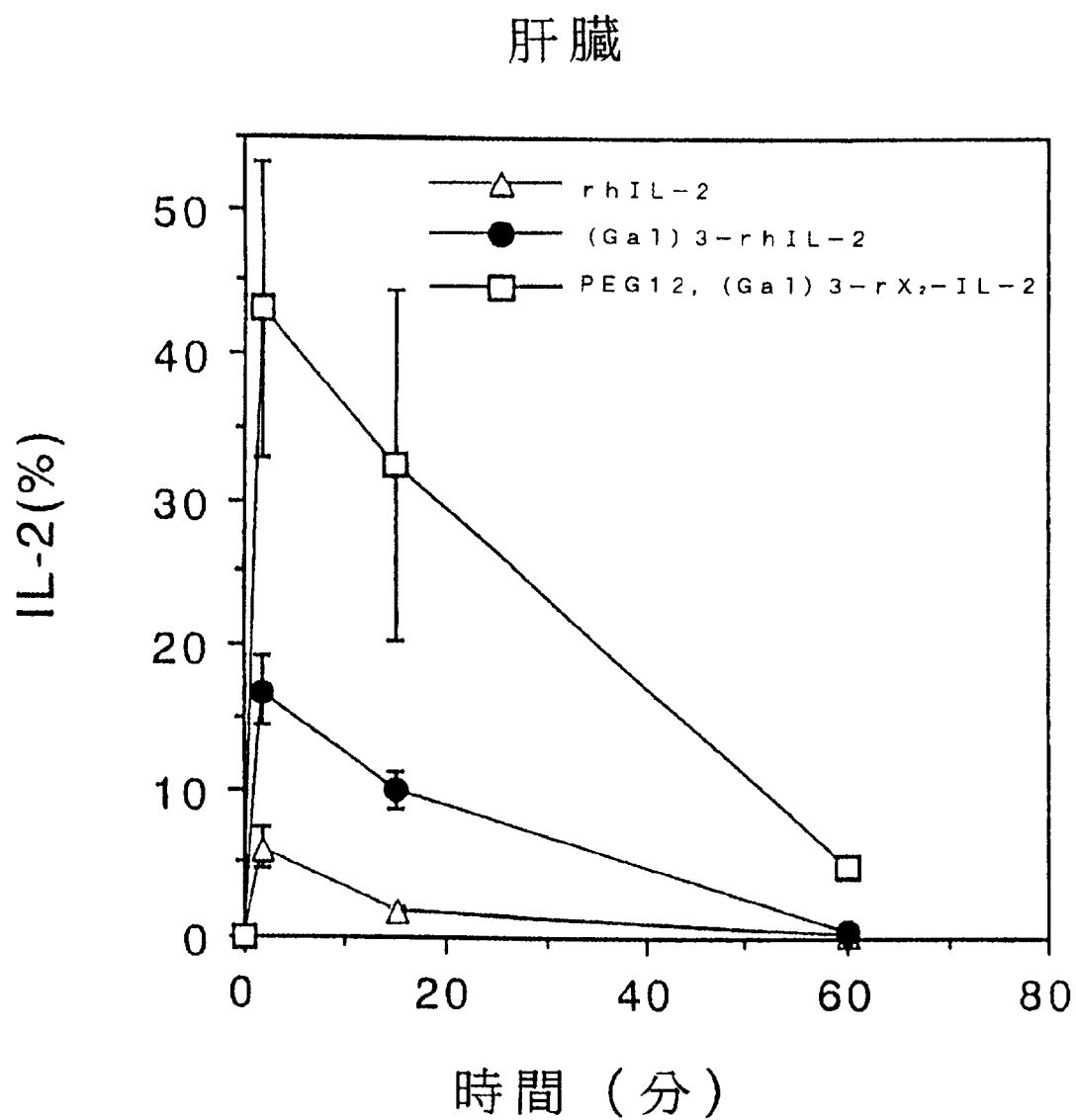


器官 g 又は ml 当たりの IL-2 (ng)

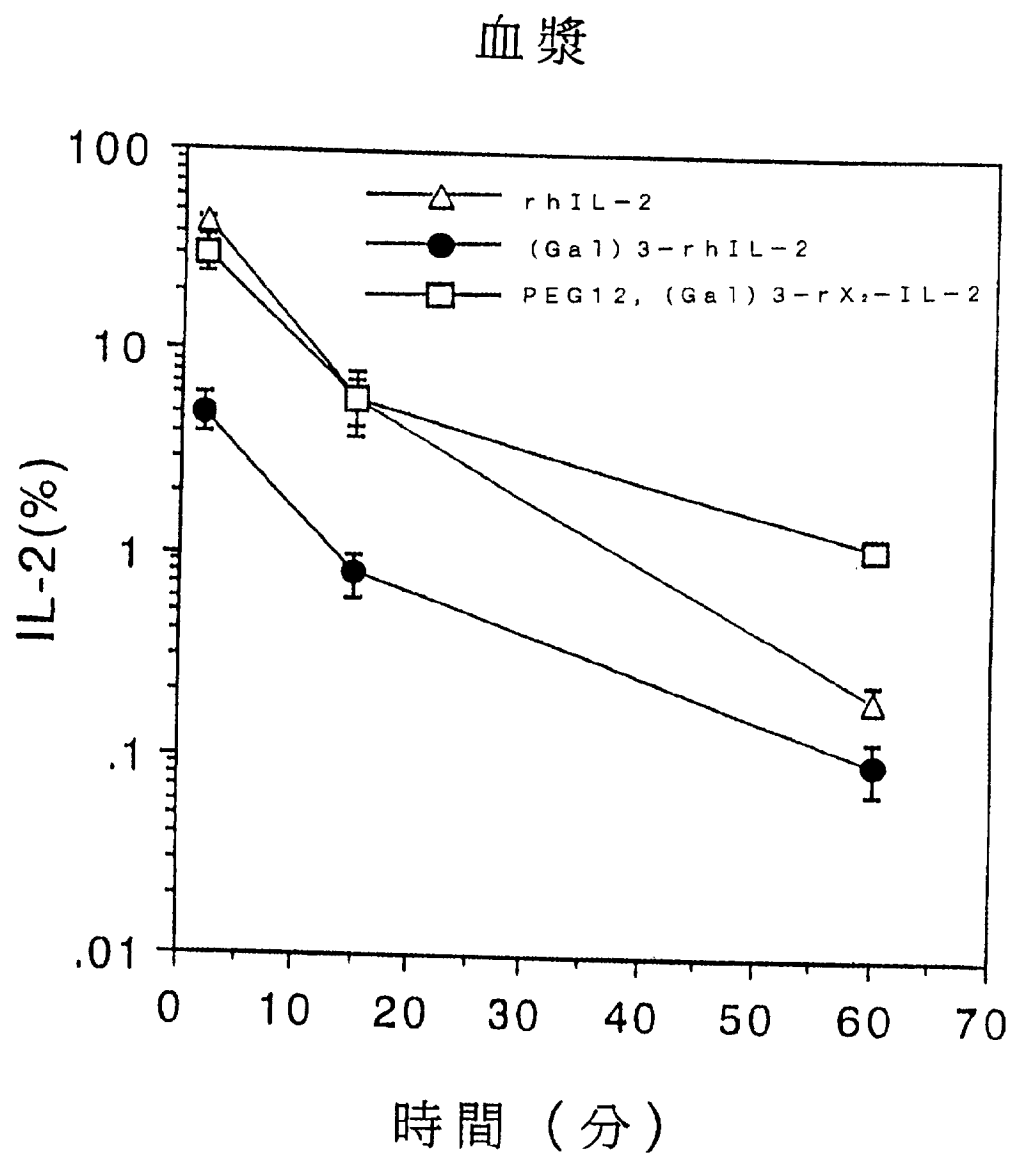
第 7 図



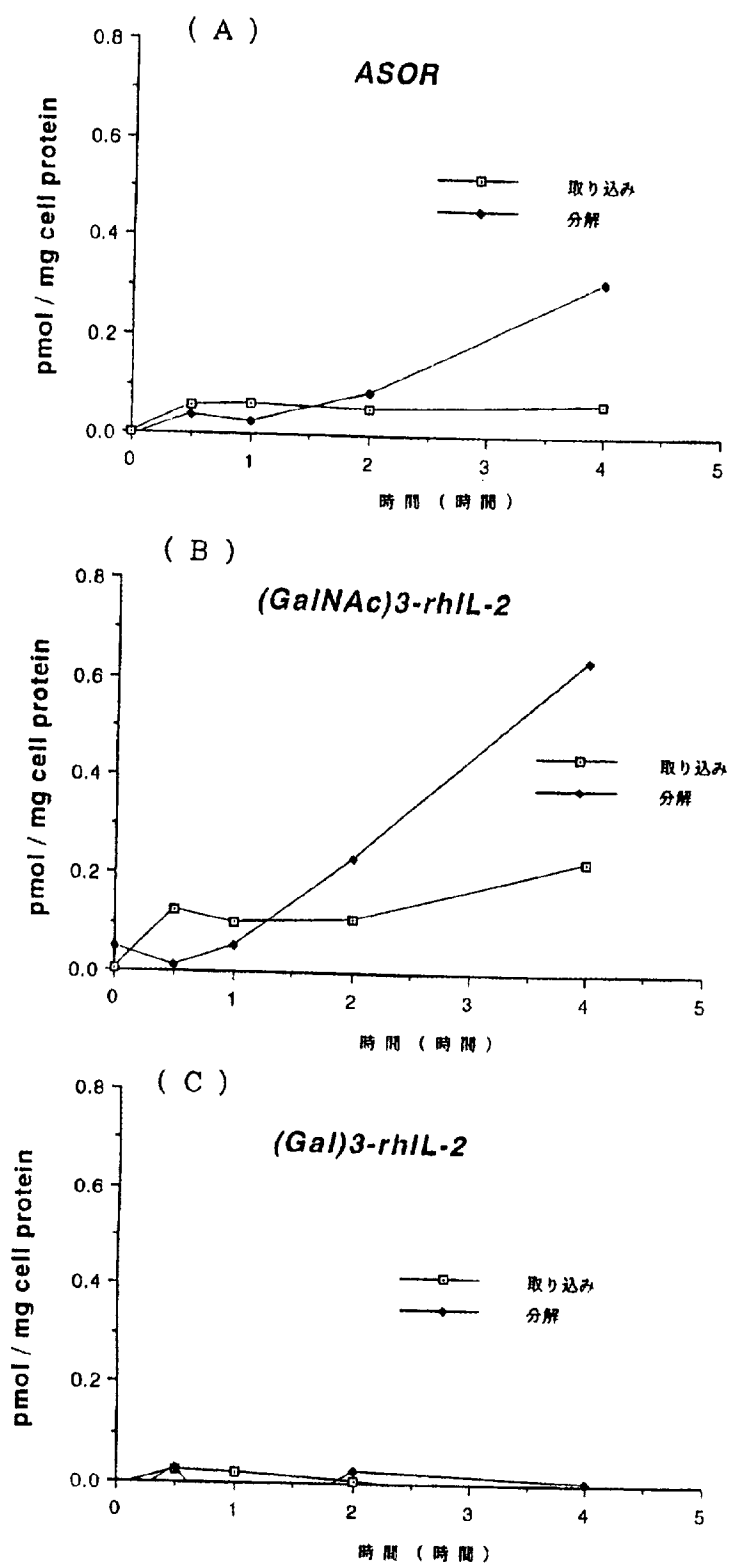
第 8 図 a



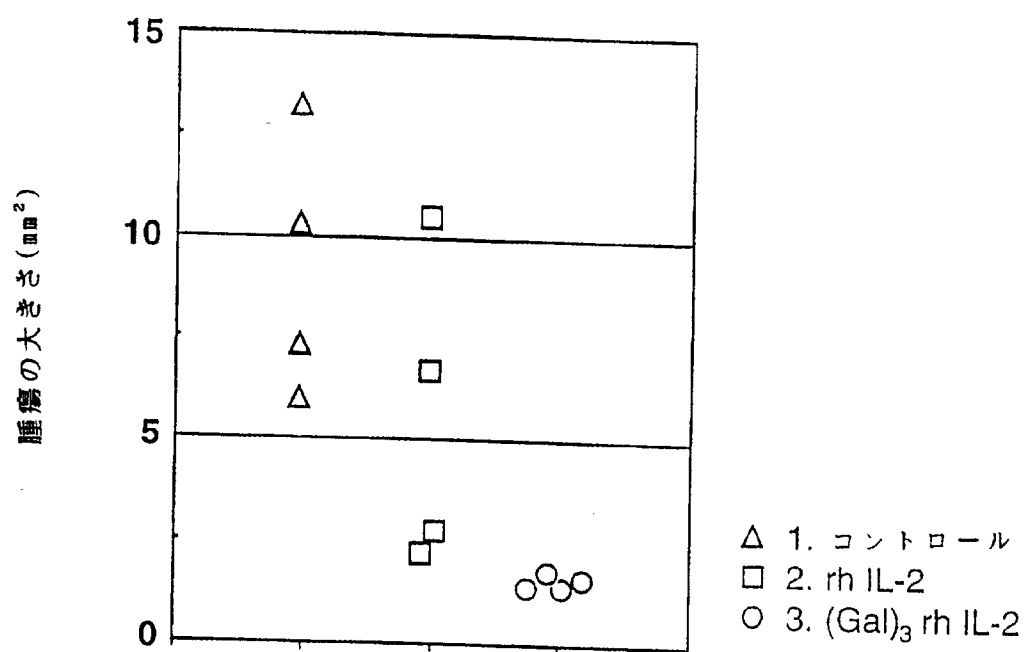
第8図b



第 9 図



第 10 図

S908. D2. vp2肝移植系における (Gal)₃-rh IL-2 の抗腫瘍効果

第 1 1 図

生化学項目	1. Saline	2. rhIL-2 (1.5 μ g/day)	3. rhIL-2 (4.4 μ g/day)	4. rhIL-2 (13.3 μ g/day)	5. rhIL-2 (40 μ g/day)
肝臓重量(w/w%)	4.30 \pm 0.31	4.48 \pm 0.24	4.66 \pm 0.34	4.91 \pm 0.58	5.07 \pm 0.11*
肺重量(w/w%)	0.57 \pm 0.02	0.58 \pm 0.04	0.58 \pm 0.05	0.64 \pm 0.05	0.72 \pm 0.01*
腎臓重量(w/w%)	0.56 \pm 0.06	0.56 \pm 0.02	0.59 \pm 0.07	0.58 \pm 0.01	0.58 \pm 0.06

生化学項目	6. (Gal) ₃ -rhIL-2 (1.5 μ g/day)	7. (Gal) ₃ -rhIL-2 (4.4 μ g/day)	8. (Gal) ₃ -rhIL-2 (13.3 μ g/day)	9. (Gal) ₃ -rhIL-2 (40 μ g/day)
肝臓重量(w/w%)	4.42 \pm 0.79	4.53 \pm 0.33	4.54 \pm 0.32	5.15 \pm 0.29*
肺重量(w/w%)	0.55 \pm 0.11	0.58 \pm 0.06	0.58 \pm 0.06	0.61 \pm 0.06
腎臓重量(w/w%)	0.56 \pm 0.08	0.57 \pm 0.04	0.58 \pm 0.06	0.57 \pm 0.08

第 1 2 図

測定項目	1. Saline	2. rhIL-2 (1.5 μ g/day)	3. rhIL-2 (4.4 μ g/day)	4. rhIL-2 (13.3 μ g/day)	5. rhIL-2 (40 μ g/day)
GOT(U/L)	53.0 \pm 19.5	52.3 \pm 15.2	52.7 \pm 7.1	63.0 \pm 20.0	83.3 \pm 10.0
GPT(U/L)	26.0 \pm 1.0	36.7 \pm 8.0	36.3 \pm 10.5	33.0 \pm 7.9	53.0 \pm 8.2*
TBIL-S (mg/mL)	0.67 \pm 0.06	0.80 \pm 0.10	0.73 \pm 0.15	0.77 \pm 0.06	1.23 \pm 0.06*
ALB-S (g/dL)	2.63 \pm 0.25	2.63 \pm 0.15	2.47 \pm 0.21	2.53 \pm 0.21	2.40 \pm 0.10
TP-S (g/dL)	4.90 \pm 0.17	5.00 \pm 0.20	4.67 \pm 0.31	4.77 \pm 0.31	4.73 \pm 0.12
BUN-S (mg/dL)	25.0 \pm 1.5	26.7 \pm 1.0	26.3 \pm 5.7	28.5 \pm 6.7	27.8 \pm 4.3

測定項目	6.(Gal) ₃ -rhIL-2 (1.5 μ g/day)	7.(Gal) ₃ -rhIL-2 (4.4 μ g/day)	8.(Gal) ₃ -rhIL-2 (13.3 μ g/day)	9.(Gal) ₃ -rhIL-2 (40 μ g/day)
GOT(U/L)	60.0 \pm 21.7	47.0 \pm 2.6	59.0 \pm 18.5	55.7 \pm 5.9
GPT(U/L)	34.3 \pm 4.0	23.7 \pm 6.7	34.3 \pm 14.0	34.3 \pm 4.9*
TBIL-S (mg/mL)	0.97 \pm 0.38	0.80 \pm 0.00	1.03 \pm 0.32	0.93 \pm 0.32
ALB-S (g/dL)	2.83 \pm 0.31	2.83 \pm 0.21	2.73 \pm 0.35	2.67 \pm 0.15
TP-S (g/dL)	5.17 \pm 0.51	5.00 \pm 0.36	4.87 \pm 0.35	5.00 \pm 0.52
BUN-S (mg/dL)	27.7 \pm 3.9	33.3 \pm 4.1	26.4 \pm 8.5	27.1 \pm 7.0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03435

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K14/52, 1/113, C07H15/04, A61K38/20, 38/21, 38/27, 38/45

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K14/52, 1/113, C07H15/04, A61K38/20, 38/21, 38/27, 38/45

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 5-202085, A (Drug Delivery System Institute, Ltd.), August 10, 1993 (10. 08. 93) (Family: none)	1 - 17
A	JP, 8-89278, A (Aginomoto Co., Inc.), April 9, 1996 (09. 04. 96) & EP, 704221, A2	1 - 17
A	WO, 96/06181, A1 (Drug Delivery System Institute, Ltd.), February 29, 1996 (29. 02. 96) & EP, 725145, A1	1 - 17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search December 4, 1997 (04. 12. 97)	Date of mailing of the international search report December 16, 1997 (16. 12. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁶ C07K14/52, 1/113, C07H15/04,
A61K38/20, 38/21, 38/27, 38/45

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁶ C07K14/52, 1/113, C07H15/04,
A61K38/20, 38/21, 38/27, 38/45

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 5-202085, A (株式会社ディ・ディ・エス研究所) 10. 8月. 1993 (10. 08. 93) (ファミリーなし)	1-17
A	J P, 8-89278, A (味の素株式会社) 9. 4月. 1996 (09. 04. 96) & EP, 704221, A2	1-17
A	WO, 96/06181, A1 (株式会社ディ・ディ・エス研究所) 29. 2月. 1996 (29. 02. 96) & EP, 725145, A1	1-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 12. 97

国際調査報告の発送日

16.12.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤原 浩子

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

4H

9155